

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1931-1932. — N° 216

RECHERCHES BIOCHIMIQUES
SUR LES
ACIDES ORGANIQUES
DE L'URINE HUMAINE

(Travail du Laboratoire de Chimie biologique et médicale).

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
MENTION « PHARMACIE »

présentée et soutenue publiquement le Vendredi 18 Mars 1932

PAR

Jean-Maurice LAFARGUE

PHARMACIEN
LAURÉAT DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE D'ANGERS
(PRIX GRIMOUX DE BACTÉRIOLOGIE, MÉDAILLE DE VERMEIL)
ET DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX
(MÉDAILLE D'OR)

PRÉPARATEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE

Né à JARNAC (Charente), le 11 juin 1906.

Examinateurs de la Thèse	{	MM. DELAUNAY, professeur.....	Président.
		CHELLE, professeur.....	Juges.
		GOLSE, professeur.....	
		VITTE, agrégé.....	

BORDEAUX
IMPRIMERIE DE L'ACADÉMIE ET DES FACULTÉS
Y. CADORET
3, PLACE SAINT-CHRISTOLY, 3

1932

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1931-1932. — N° 216

RECHERCHES BIOCHIMIQUES
SUR LES
ACIDES ORGANIQUES
DE L'URINE HUMAINE

(Travail du Laboratoire de Chimie biologique et médicale).

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
MENTION « PHARMACIE »

présentée et soutenue publiquement le Vendredi 18 Mars 1932

PAR

Jean-Maurice LAFARGUE

PHARMACIEN
LAURÉAT DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE D'ANGERS
(PRIX GRIMOUX DE BACTÉRIOLOGIE, MÉDAILLE DE VERMEIL)
ET DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX
(MÉDAILLE D'OR)

PRÉPARATEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE
Né à JARNAC (Charente), le 11 juin 1906.

Examineurs de la Thèse	{	MM. DELAUNAY, professeur.....	Président.
		CHELLE, professeur.....	Juges.
		GOLSE, professeur.....	
		VITTE, agrégé.....	

BORDEAUX
IMPRIMERIE DE L'ACADÉMIE ET DES FACULTÉS
Y. CADORET
3, PLACE SAINT-CHRISTOLY, 3

1932

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

M. SIGALAS..... Doyen.



PROFESSEURS HONORAIRES :

POUSSON, MOURE, PRINCETEAU, W. DUBREUILH, RIVIÈRE,
BARTHE, DENIGÈS, AUCHÉ.

PROFESSEURS

MM.

Clinique médicale.....	MAURIAC.
id.....	CASSAET.
Clinique chirurgicale.....	CHAVANNAZ.
id.....	BÉGOUIN.
Pathologie et thérapeutiques générales.....	GARLES.
Clinique d'accouchements.....	ANDÉRODIAS.
Anatomie pathol. et microscopie clinique.....	SABRAZÈS.
Anatomie.....	VILLEMIN.
Anatomie générale et histologie.....	G. DUBREUILH.
Physiologie.....	PACHON.
Hygiène.....	LEURET.
Médecine légale et déontologie.....	LANDE.
Electroradiologie et clin. d'électricité médic.....	RÉCHOU.
Chimie.....	CHELLE.
Botanique et matière médicale.....	BEILLE.
Pharmacie.....	DUPOUY.

MM.

Zoologie et parasitologie.....	MANDOUL.
Médecine expérimentale.....	DUPÉRIÉ.
Clinique ophtalmologique.....	TEULIÈRES.
Clinique chirurg. infantile et orthopédie.....	ROCHER.
Clinique gynécologique.....	GUYOT.
Clinique méd. des maladies des enfants.....	CRUCHET.
Chimie biologique et médicale.....	DELAUNAY.
Physique médicale et pharmaceutique.....	SIGALAS.
Médec. coloniale et clin. des mal. exotiques.....	BONNIN.
Clinique des malad. cutanées et syphilitiques.....	PETGES.
Clinique des maladies des voies urinaires.....	DUVERGEY.
Clinique des malad. nerveuses et mentales.....	ABADIE.
Clinique d'oto-rhino-laryngologie.....	PORTMANN.
Toxicologie et hygiène appliquée.....	LABAT.
Hydrologie thérapeutique et climatologie.....	SELLIER.
Clinique dentaire.....	CAVALIÉ.

MM MICHELEAU (Médecine générale). MURATET (Anatomie pathologique). GOLSE (Pharmacie).
LACOSTE (Histologie).

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

MM.

Anatomie.....	DUBECQ.
id.....	DUFOUR.
Physiologie.....	FABRE.
Parasitologie et sciences naturelles.....	R. SIGALAS.
Médecine générale.....	GREYX.
id.....	AUBERTIN.
id.....	DAMADE.
id.....	PIÉCHAUD.
id.....	DELMAS-MARSALET.
Maladies mentales.....	PERRENS.

MM.

Chirurgie générale.....	PAPIN.
id.....	JEANNENEY.
id.....	CHARRIER.
id.....	LOUBAT.
Obstétrique.....	PERY.
id.....	RIVIÈRE.
Ophtalmologie.....	BEAUVIEUX.
Dermatologie et syphiligraphie.....	JOULIA.
Chimie générale pharmaceut. et toxicologie.....	VITTE.

COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM.

Médecine opératoire.....	PAPIN.
Physiologie.....	FABRE.
Accouchements.....	RIVIÈRE.
Ophtalmologie.....	CABANNES.

MM.

Puériculture.....	FAUGÈRE.
Démonstrations et préparations pharmac.....	GOLSE.
Zoologie et parasitologie.....	R. SIGALAS.

Orthopédie chez l'adulte, pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes. MM. N.
Cours complémentaire annexe. — Prothèse et rééducation professionnelle..... GOURDON.
id..... Clinique dentaire..... DELGUEL.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

A MES MAITRES
DE L'ECOLE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE D'ANGERS
ET DE LA FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
DE BORDEAUX

A MON PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR H. DELAUNAY

*Professeur de Chimie biologique et médicale à la Faculté de Médecine,
Docteur ès Sciences naturelles,
Membre correspondant de la Société de Biologie,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Croix de guerre,
Officier de l'Instruction publique.*

RECHERCHES BIOCHIMIQUES

SUR LES

ACIDES ORGANIQUES

DE L'URINE HUMAINE

INTRODUCTION

Depuis que l'on a reconnu le caractère acide de l'urine humaine normale, bien des travaux ont été effectués dans le but de déterminer, qualitativement d'abord, puis quantitativement, quels étaient les corps qui contribuaient à former cette acidité. M. le Professeur Denigès a soigneusement exposé, en 1884, les premières étapes de ces travaux et a déterminé, à l'aide de recherches personnelles, que « l'acidité de l'urine paraît due, par ordre d'importance : 1° aux phosphates monométalliques ou phosphates acides; 2° aux acides urique, carbonique, hippurique et à leurs sels acides; 3° à des traces probables d'acides minéraux libres et à de petites quantités de nombreux acides de la série aromatique ». Une place était donc déjà réservée, au point de vue qualitatif, aux acides organiques dans l'acidité urinaire.

Ces premières acquisitions ont motivé l'élaboration de nombreuses méthodes destinées à la détermination quantitative, d'abord, de cette acidité globale, ensuite de celle de ses

divers éléments. Denigès, Jégou, Blarez, Grimbart et Morel ont été les principaux auteurs de ces méthodes et ont vu qu'il était de toute nécessité de tenir compte des acides organiques dans la répartition quantitative de l'acidité urinaire.

Au cours de cette deuxième période se sont élevées des controverses au sujet des résultats fournis par certaines de ces méthodes, en particulier sur la répartition de l'ion phosphorique entre les différents phosphates mono et bimétalliques. C'est alors qu'est intervenue la notion physico-chimique du pH urinaire, capable, en renseignant sur la valeur de l'acidité ionique, d'apporter de précieuses lumières sur la répartition exacte des différents éléments de l'acidité titrable.

La connaissance de l'acidité organique libre urinaire en a largement bénéficié, comme nous le verrons.

Mais la question des acides organiques urinaires a pris un tout autre aspect depuis que l'on s'est rendu compte que l'acidité organique libre, décelable à la titration, ne constituait qu'une partie de l'ensemble des acides organiques totaux qui se partagent, suivant la réaction physico-chimique de l'urine, en deux fractions, dont l'une est libre et l'autre saturée, à l'état de sels neutres ou acides, par des bases, fixes ou volatiles. De sorte qu'on a été amené (van Slyke et Palmer) à étudier quantitativement le bloc total des acides organiques de l'urine, dont l'intérêt physiologique a été bien établi par Dakin [17].

Les acides organiques jouent en effet un rôle important dans le métabolisme des êtres vivants. L'analyse ne décèle, il est vrai, que des quantités relativement faibles de ces acides, soit libres, soit salifiés, dans les tissus, les organes, le sang et les produits d'excrétion; les aliments eux-mêmes n'en contiennent que fort peu.

Mais on sait depuis longtemps que si l'on soumet à l'action de divers agents chimiques appropriés les éléments constitutifs de toute cellule vivante, on obtient une grande quantité de corps qui présentent tous le caractère acide. De plus, on a pu mettre en évidence le fait que l'organisme procède

à l'utilisation des matériaux ingérés en les faisant passer, au moyen de processus diastasiques divers, par les mêmes stades acides que l'on a pu caractériser (V. Woringer [70]). Les protides fournissent, par hydrolyse, presque quantitativement des acides aminés, qui, après désamination, donnent des acides organiques; les lipides, plus de 90 p. 100 d'acides gras, et les lécithines, 70 p. 100. Les glucides semblent se comporter différemment; toutefois il appert que leur métabolisme intermédiaire s'effectue en passant par un stade acide, l'acide lactique, qu'on sait être formé en grande quantité dans le muscle à partir du glycogène, stade qui ne serait qu'une forme transitoire destinée à l'utilisation par « resynthèse ».

Au cours du métabolisme intermédiaire, l'organisme produit donc une quantité considérable d'acides organiques. Lorsqu'ils présentent quelque résistance particulière les rendant indestructibles par les moyens dont dispose l'organisme, ils sont excrétés en molécules plus ou moins grosses, comme l'acide urique, produit ultime de la dégradation oxydative des nucléoprotéides chez l'Homme, et l'acide hippurique, forme copulée et inoffensive des noyaux aromatiques toxiques pour l'organisme : c'est la désassimilation. Tous les autres sont utilisés : une partie est employée à la construction des molécules d'albumines, de graisses et de sucres dont l'organisme a besoin pour vivre : c'est l'assimilation ou resynthèse; le reste est comburé.

Toutefois, les combustions organiques et les processus d'assimilation n'arrivent jamais à un degré de perfection tel qu'on ne retrouve dans l'urine une certaine quantité d'acides organiques, qui seront d'autant plus nombreux et à molécule d'autant plus grosse que l'utilisation se fera plus mal. De là découle toute l'importance attribuée à la somme globale des acides organiques non brûlés ou non utilisés et qui sont éliminés par l'urine, et ici se pose la première des questions que nous envisagerons dans notre étude : la détermination des *acides organiques urinaires totaux*.

Non abordée pendant fort longtemps, cette question a reçu, en 1920 (van Slyke), une première solution, séduisante de prime abord par la facilité de sa mise en œuvre, mais qui laisse voir, à l'examen approfondi, un manque de précision qui a conduit à admettre, pour l'excrétion normale des acides organiques totaux, des valeurs beaucoup trop élevées. Une deuxième solution, plus récente (Widmark), est très satisfaisante dans ses résultats, mais elle possède l'inconvénient considérable d'être fort peu praticable dans les laboratoires non munis d'un outillage spécial. L'exposé de ces méthodes, leur étude critique, les enseignements que cette dernière permet d'en tirer, l'établissement d'un microdosage précis et facile à mettre en œuvre, avec les résultats qu'on en peut attendre, constitueront la première partie de notre travail.

La notion importante que tous ces acides organiques possèdent une constante de dissociation très faible nous ramène tout naturellement, par le seul examen de leurs courbes de titration, qui sont presque toutes, en grande partie, situées dans les limites de pH entre lesquelles varie l'acidité ionique urinaire, au rôle qu'ils jouent dans l'*acidité urinaire libre totale*.

La détermination précise, à l'aide du pH, de la part relevant aux éléments minéraux et organiques dans cette acidité titrable nous a permis d'instituer une méthode de dosage de l'acidité organique urinaire libre totale qui fera, avec l'étude de ses rapports avec d'autres éléments de l'acidité urinaire, l'objet d'un deuxième chapitre.

Mais l'organisme peut procéder à l'oxydation par plusieurs moyens, et l'oxydation d'un des produits directement oxydables du métabolisme peut être complètement entravée sans que cela implique une diminution de sa capacité d'oxydation pour d'autres acides. Il est alors évident que s'il est important de connaître la quantité totale des corps directement oxydables excrétés, les acides organiques totaux, les variations dans les excrétions individuelles de ces acides n'ont pas un moindre intérêt (Dakin).

Mais, à ce point, la question devient plus complexe. Les acides organiques excrétés sont si nombreux et si variés qu'on est dans l'impossibilité, dans l'état actuel de notre science, de doser tous ces acides, dont un grand nombre ne se trouvent qu'en quantités infimes. Une troisième question se pose donc ici, celle de la *répartition des acides organiques totaux*, c'est-à-dire de la place prise par chaque élément séparé dans cet ensemble complexe. Question ardue, si l'on considère qu'aucune solution ne lui a encore été apportée; quelques recherches ont été effectuées isolément, suscitées par l'importance pathologique de certains de ces acides, les acides cétoniques par exemple. Au point de vue physiologique, nous ne possédons que des chiffres épars sur l'excrétion des acides formique, lactique, oxalique, hippurique. Aussi avons-nous abordé la question en commençant par séparer le bloc des acides organiques totaux en acides volatils, dont les éléments constitutifs sont bien connus et assez peu nombreux, et acides fixes. De ce reste fixe, nous avons isolé ceux qui sont susceptibles d'une détermination précise, l'acide lactique et l'acide hippurique.

Cette première répartition, encore que bien incomplète, permet toutefois d'avoir des renseignements sur la composition quantitative de l'ensemble des acides organiques urinaires.

Il était intéressant de déterminer ce que cet ensemble renfermait de carbone total et d'azote total. Cet intérêt se justifie si l'on se représente que l'azote et le carbone de ces acides font partie de l'indosé azoté et carboné de l'urine, et que, si le premier ne s'élève qu'à 6 p. 100 environ de l'azote total, le second atteint souvent le tiers, ou davantage, du carbone total. Dans ce but, nous avons mis au point un procédé d'isolement des acides organiques totaux permettant la *détermination exacte de leur azote et de leur carbone constitutifs*. Les résultats obtenus nous ont permis d'abord de classer les acides organiques parmi les substances carbonées et fort peu azotées éliminées à l'état physiologique par l'urine et

qui contribuent au relèvement du rapport C/N de 0,5, valeur calculée, à 0,7-0,8, valeur expérimentale; puis d'effectuer un essai sur la répartition du carbone urinaire, parallèle à celle de l'azote. Enfin la fixité remarquable, à l'état physiologique, du carbone des acides organiques par rapport au carbone total nous a permis de considérer le pourcentage ainsi calculé comme mesurant la capacité d'oxydation (ou d'utilisation), de l'organisme vis-à-vis des acides organiques, et de lui donner le nom d'*indice d'acido-carbonurie*, ou pourcentage par rapport au carbone total du carbone excrété sous forme acide. La connaissance de cette capacité d'oxydation des produits acides du métabolisme intermédiaire permet de classer les diverses dyscarbonuries caractérisées par l'élévation du rapport C/N en dyscarbonuries acides (indice d'acido-carbonurie élevé), neutres (indice d'acido-carbonurie normal, et forte excrétion d'un carbone indéterminé neutre, glucidique ou autre), ou participant à la fois de ces deux processus.

En dehors de ce rapport, nous avons étudié les variations des acides organiques concurremment à celles d'autres éléments de l'élimination urinaire (azote hypobromite, azote ammoniacal, azote aminé, etc.), ce qui nous a permis de considérer le rapport des acides organiques totaux à l'azote hypobromite comme pouvant déjà renseigner correctement sur l'état d'acidose, relative ou absolue, sans toutefois prétendre aux mêmes indications que le précédent.

Nous avons effectué des expérimentations afin d'éclairer l'élimination physiologique des acides organiques avec les diverses conditions de régime alimentaire, et y avons joint l'étude de l'acidose expérimentale par exercice physique poussé jusqu'à la fatigue, ou acidose lactique, cela au point de vue répartition des acides organiques totaux. Enfin nous avons réuni quelques chiffres fournis par l'application de nos méthodes d'investigation à des cas physio-pathologiques et pathologiques.

CHAPITRE PREMIER

LES ACIDES ORGANIQUES URINAIRES TOTAUX

D'après ce que nous savons sur l'origine des acides organiques urinaires, il est à prévoir qu'ils sont très nombreux et très variés; mais il ne faut pas perdre de vue que leur nombre dépend de la capacité plus ou moins grande d'oxydation de l'organisme et qu'il est difficile de dresser la liste de ceux qui sont normalement éliminés. Une telle notion justifie d'ailleurs le fait de les réunir en un bloc sous la dénomination : *acides organiques urinaires*. Toutefois, on a pu mettre en évidence un grand nombre d'acides organiques dans l'urine; ce sont d'abord les premiers termes de la série aliphatique, constituant les acides volatils : formique, acétique, propionique, butyrique et isobutyrique, valérique et isovalérique; puis des diacides, acides alcools, acides cétoniques, etc. : oxalique, succinique, lactique, acétylacétique, β -oxybutyrique, glycuronique, etc. Dans la série cyclique, nous trouvons, comme homocycliques : l'acide hippurique, phénacéturique, para-oxyphénylacétique, uroleucique, para-oxyphénylpropionique, homogentisique (ou 1,4-dioxyphényl 3-acétique); comme hétéro-cycliques, l'acide indolacétique et ses homologues; enfin l'acide urique. Tous ces acides n'ont pas la même importance quantitative : il en est qui n'existent qu'à l'état de traces et d'autres en quantités pondérables. La question de la présence d'une assez grande proportion d'acide citrique dans l'urine, à l'état normal, est à l'ordre du jour et ne semble pas avoir été résolue de manière définitive. Les travaux ayant été effectués sur cette question par Salant et Wise [59], Amberg et Mac Clure [4] en 1917, Amberg et Mary E. Mayer [2], en

1922 et, depuis, par Torsten Thunberg [62] et Ostberg [58] ont été rassemblés et complétés dans la récente étude de E. Cattelain [13].

LES METHODES DE DOSAGE

Les procédés de dosage des acides organiques urinaires se classent en deux groupes : le premier utilisant la titration directe suivant une gamme de pH déterminée, le second comportant l'extraction préalable des acides à l'aide d'un solvant approprié, puis leur titrage acidimétrique.

LES MÉTHODES PAR TITRATION DIRECTE.

Le premier groupe est représenté par la méthode due à Donald D. van Slyke et W. Palmer [63]. Elle est basée sur les faits suivants :

1° Une quantité relativement minime d'un acide minéral fort est nécessaire pour faire passer de pH 8 à pH 2,7 une solution aqueuse ne contenant que des sels d'acides forts, tels que sulfates et chlorures.

2° Si la solution contient un sel d'acide faible, l'addition de, sensiblement, une molécule d'acide chlorhydrique par molécule de sel présent est nécessaire pour opérer la même transformation dans la réaction ionique. Les acides considérés comme pouvant se rencontrer dans les urines normales et pathologiques en quantité suffisante pour représenter une certaine part de l'excrétion acide totale de l'organisme appartiennent à la catégorie des acides faibles, dont les sels se comportent comme il vient d'être dit.

3° Les acides minéraux existant en quantités notables dans l'urine, et appartenant à cette même catégorie sont les acides phosphorique et carbonique.

4° Les bases très faibles donnent des sels se comportant comme ceux des acides faibles. La créatinine est titrée presque quantitativement dans la gamme de pH comprise entre

8 et 2,7, et la créatine pour 60 p. 100 environ. A part de petites quantités d'acides aminés, ce sont à peu près les seules bases de ce genre présentes en quantités notables dans l'urine.

En conséquence, les auteurs ont établi le mode opératoire suivant : 100 cm³ d'urine sont additionnés de 2 grammes d'hydroxyde de calcium finement pulvérisé et, après trituration soigneuse, laissés en repos un quart d'heure et filtrés sur papier sec. Ce traitement enlève les phosphates et les carbonates. On place 25 cm³ du filtrat dans un grand tube de 125-150 cm³, et on ajoute 0 cm³ 5 de phénolphtaléine à 1 p. 100 et de l'acide chlorhydrique cinquième-normal jusqu'à exacte décoloration (pH environ 8), puis 5 cm³ d'une solution à 0,02 p. 100 de tropénine 00, en agitant, pour éviter la précipitation d'un peu de cet indicateur. Finalement, on verse, d'une burette, l'acide chlorhydrique, cinquième-normal jusqu'à égalité de teinte avec un étalon contenant 0 cm³ 6 du même acide chlorhydrique titré, 5 cm³ de la solution de tropéoline 00 et de l'eau jusqu'à volume total de 60 cm³. Lorsque l'on approche de la teinte témoin, on ajoute dans la solution à titrer suffisamment d'eau pour amener le volume à 60 cm³, afin que la comparaison se fasse sous une même épaisseur d'un même volume, les deux liquides étant placés dans des tubes semblables.

Il est avantageux d'opérer de la même façon, comparativement à un tube contenant seulement du filtrat, pour la décoloration exacte de la phtaléine. La comparaison peut d'ailleurs être facilitée par l'emploi d'un comparateur genre Dernby et Avery, bien que, sans cela, on puisse atteindre le point final avec une approximation de 0 cm³ 1.

Du volume d'acide cinquième-normal ainsi employé, il faut retrancher la valeur du témoin, soit 0 cm³ 6; le reste représente l'acidité organique totale approximative de l'urine examinée, plus la créatine et la créatinine et une quantité d'amino-acides ordinairement négligeable. Les résultats seront exprimés en centimètres cubes de liqueur décinormale par litre, en multipliant le chiffre ainsi corrigé par 80.

Les auteurs donnent accessoirement la correction à établir pour la créatinine. Celle-ci, à la concentration décimoléculaire, se comporte, au point de vue titration, sensiblement comme une solution décinormale d'un acide organique. Le chiffre d'acidité organique calculé précédemment doit alors être diminué d'une quantité égale au nombre de milligrammes de créatinine par litre, divisé par 11,32.

La justification du dosage de la presque totalité des acides organiques de l'urine par cette méthode a été donnée; elle peut être résumée dans le tableau suivant :

Acides.	Constante de dissociation.	Acide libre à		Proportion titrée de pH 8 à pH 2,7.
		pH 8	pH 2,7.	
Urique.....	$1,5 \times 10^{-6}$	0,5	99,9	99,4
Acétique.....	$1,8 \times 10^{-5}$	0,0	99,2	99,2
β -oxybutyrique..	$2,0 \times 10^{-5}$	»	99,0	99,0
Lactique.....	$1,4 \times 10^{-4}$	»	93,5	93,5
Acétylacétique...	$1,5 \times 10^{-4}$	»	93,1	93,1
Citrique.....	$2,0 \times 10^{-4}$	»	91,0	91,0
Formique.....	$2,1 \times 10^{-4}$	»	90,6	90,6
Hippurique.....	$2,2 \times 10^{-4}$	»	90,2	90,2

qui montre que certainement plus de 90 p. 100 des acides organiques de l'urine et probablement plus de 90 p. 100, étant donné qu'une plus-value de 3 à 4 p. 100 est fournie par ceux de ces acides excrétés sous forme de sels ammoniacaux, sont ainsi titrés.

L'étude de l'effet des bases faibles sur la titration a été établie parallèlement; il est montré par le tableau :

Bases.	Constante de dissociation.	Base libre à		Proportion titrée de pH 8 à pH 2,7.	
		pH 8.	pH 2,7.		
Urée.....	$0,0015 \times 10^{-11}$	100	99,7	0,3	0,2
Créatinine...	$1,81 \times 10^{-11}$	100	24,0	76,0	99,0
Créatine.....	$3,87 \times 10^{-11}$	100	12,3	87,7	60,0
Ammoniaque.	$1,5 \times 10^{-5}$	6,2	0,0	6,2	6,0
				calculée.	déterminée expériment.

La différence constatée entre les chiffres calculés et ceux établis expérimentalement pour la créatine et la créatinine

est probablement due au fait que les chiffres donnés par Woods pour leurs constantes de dissociation ont été déterminés à 40 degrés, alors que les titrages s'effectuent à 20 degrés environ. Il en ressort toutefois indiscutablement que la créatinine est titrée comme un acide organique. Quant à la créatine, son excrétion infime par rapport à celle de la créatinine peut être négligée.

Les auteurs estiment ensuite que la perturbation apportée par l'ammoniaque peut ne pas être prise en considération, pour les raisons que les acides éliminés sous forme de sels ammoniacaux sont titrés de 2,3 à 4,5 p. 100 plus complètement que ceux éliminés comme sels de sodium; la plus-value légère qui en résulte est contre-balancée par la moins-value de titration de l'ensemble des acides et, comme l'excrétion des acides organiques va généralement de pair avec celle de l'ammoniaque, les chiffres comparatifs n'en sont pas affectés.

Enfin le trouble apporté par les acides aminés a été étudié par van Slyke et Palmer sur le glyocolle, dont le pourcentage du carboxyle libre à pH 8 est de 96,7, à pH 2,7 de 100, ce qui donne, pour la portion titrée en parcourant cette gamme, 3,3 p. 100; pour son groupe aminé, un pourcentage libre de 100 à pH 8 et de 63,3 à pH 2,7 en laisse titrer dans la même échelle 36,7 p. 100, ce qui représente en tout 0,4 molécule d'acide N/10 absorbé par molécule de glyocolle; les autres amino-acides se comportent à peu près comme ce dernier : 44 p. 100 des groupes aminés obtenus par hydrolyse de la caséine sont titrés de pH 8 à pH 2,7. Ceci conduit à une correction calculable en multipliant par 3,2 le nombre de centigrammes d'azote aminé dosé dans l'urine.

Etant données sa simplicité et sa rapidité, cette méthode a été adoptée par nombre de chercheurs, dont quelques-uns lui ont apporté des modifications de technique et de mode opératoire. C'est ainsi que Goiffon et Nepveux [27] opèrent la défécation calcique en présence de phtaléine en ajoutant la chaux par pincées successives jusqu'à réaction alcaline; le

reste du dosage est effectué identiquement, comme van Slyke et Palmer l'ont indiqué, en se servant toutefois d'acide chlorhydrique décinormal au lieu de cinquième-normal, ce qui a surtout pour résultat de rendre le virage, déjà peu net, encore plus indécis.

C'est justement pour remédier à cet inconvénient que Guillaumin [32] retourne à l'emploi de l'acide chlorhydrique cinquième-normal et opère la titration en se servant d'un chromoscope comparateur à gros trous, en corrigeant la teinte de l'étalon par la superposition d'un tube contenant 25 cm³ du filtrat, franchement acidifié, dilué à 60 cm³ avec de l'eau. Le point de départ a été soigneusement obtenu, à pH 8, par la comparaison avec ce dernier filtrat acidifié (non étendu), en décolorant les 25 cm³ destinés à la titration avec l'acide chlorhydrique à 10 p. 100, revenant au rose avec HONa décinormale, et décolorant exactement par l'acide chlorhydrique cinquième-normal, en s'arrêtant dès égalité des deux teintes. L'auteur estime que le virage est exact à 0 cm³ 3 ou 0 cm³ 5 près seulement.

Mainzer et Joffre [46] ont adapté la méthode de van Slyke et Palmer à la microanalyse sans introduire aucune modification dans son principe; ils opèrent la titration sur 10 cm³ du filtrat dilué à 50 p. 100, avec de l'acide chlorhydrique N/4 versé d'une microburette libérant des gouttes du volume de 1/100 de centimètre cube, avec comme indicateur le sel de potassium de l'acide benzylaniline p-benzolsulfonique, comparativement à des étalons constitués avec des solutions tampons d'acide citrique et de phosphate monoacide de sodium. Le seul intérêt de cette modification est son caractère d'exactitude quant au point de virage et son échelle microanalytique.

Enfin, récemment, Greenwald [28], cherchant à obtenir un virage plus net dans la titration suivant van Slyke et Palmer et aussi à éviter la nécessité d'une correction pour la créatinine et la créatine, a traité l'urine avant la délécation calcique, par le réactif de Lloyd, employé par Folin et Berglund

dans le dosage des sucres de l'urine normale [23], réactif constitué par une terre à foulon à grand pouvoir adsorbant. Non seulement le virage, sur un liquide incolore, est plus net, mais cette défécation enlève aussi à l'urine une ou plusieurs substances indéterminées exerçant un pouvoir tampon marqué entre pH 8 et pH 2,7, que l'acide phosphotungstique enlève aussi, mais que la défécation chaux-cuivre ne touche pas, ce qui fait supposer que ces corps sont des substances azotées à caractère basique ou amphotère. Quoi qu'il en soit, les chiffres d'acides organiques ainsi obtenus sont considérablement plus faibles que ceux fournis sans défécation préalable au réactif de Lloyd, bien que les essais de contrôle aient montré que des acides organiques ajoutés en quantité connue à des urines étaient à peu près intégralement retrouvés; les différences, qui valent d'être reportées, sont les suivantes :

Acides organiques excrétés en vingt-quatre heures,
en cm³ N/10 :

A	B	C	D
URINES NORMALES.			
330	225	182	91
329	221	248	132
326	208	161	113
475	326	336	196
629	465	382	186
URINES DE PNEUMONIQUES.			
1.725	1.533	531	326
1.531	1.324	438	451
926	779	478	337
1.097	717	500	390
1.439	1.223	598	437
780	653	319	296

A représente les chiffres fournis par la méthode de van Slyke et Palmer bruts; B, après correction de la somme créatinine + créatine; C, avec la défécation préalable à l'acide phosphotungstique; D, après défécation au réactif de Lloyd. On voit qu'à l'état normal la modification apportée par

Greenwald abaisse (au tiers environ de son taux primitif), la quantité d'acides organiques titrés directement de pH 8 à pH 2,7, et que, par ailleurs, la défécation phosphotungstique conduit à des résultats inconstants, qui empêchent de la substituer à la défécation à l'aide du réactif de Lloyd.

Etude critique de ce groupe de méthodes.

Mettant à part la modification apportée par Greenwald, qui malheureusement nécessite un réactif spécial d'un usage peu courant et d'approvisionnement difficile, nous ferons l'étude critique de la méthode fondamentale de van Slyke et Palmer, qui a fourni à presque tous les auteurs ayant fait des travaux sur les acides organiques urinaires les chiffres bruts qu'ils ont utilisés sans correction.

Elle permet de titrer tous les acides organiques dont les sels de calcium sont solubles; à cet égard, il n'y a guère que l'acide oxalique qui échappe à la titration; l'acide urique doit intervenir pour sa première fonction acide seulement, qui est à peu près complètement titrée, comme l'indique van Slyke. Si certains autres acides ne sont titrés que pour 90 p. 100 seulement environ (hippurique, formique), ce qui fait tomber le pourcentage de la totalité titrée aux environs de 95 p. 100, nous ne pensons pas, avec les auteurs, que la légère plus-value fournie par la titration de ceux existant à l'état de sels ammoniacaux doive être à retenir. En effet, lors de la défécation par la chaux, le liquide est à une valeur de pH élevée (bien supérieure à 8), valeur à laquelle toute l'ammoniaque est déplacée par la chaux; en particulier, celle-ci a remplacé l'ammoniaque qui se trouvait unie à des radicaux organiques acides. Quand on amène le liquide de titration à pH 8, l'acide chlorhydrique ajouté sature la chaux en excès et l'ammoniaque déplacée, en sorte que c'est bien sur des sels sodiques, potassiques et calciques des acides organiques que s'effectue la titration de ces derniers par déplacement, mais non sur des sels ammoniacaux. La plus-value escomptée par l'auteur n'existe donc pas en réalité.

L'erreur par défaut ainsi commise doit donc être évaluée à 3 p. 100 du chiffre des acides organiques présents; nous allons voir qu'elle est énormément inférieure à l'erreur en excès provenant des bases dont l'action a été examinée par van Slyke et Palmer et aussi d'autres corps de nature indéterminée.

Les auteurs ont indiqué la correction à faire pour la créatinine; elle peut s'obtenir en multipliant par 88 le poids, en grammes, de ce corps existant par litre de l'urine examinée. c'est-à-dire qu'elle se place généralement aux environs de 100 cm³ de liqueur décimale par litre; celle due à la présence des acides aminés, qu'on peut évaluer, en centimètres cubes de cette même liqueur, en multipliant par 3,2 le nombre de centigrammes d'azote aminé dosé dans un litre de l'urine; enfin celle de l'ammoniaque, représentant 6 p. 100 de sa valeur, toujours en liqueur décimale.

Pour se rendre compte du pourcentage que peuvent représenter ces erreurs en excès, il est nécessaire de prendre des exemples.

Urines. Volume par 24 heures.	Acidité organique Van Slyke-Palmer		Erreurs en excès			Total des erreurs	Pourcentage de l'excès par rapport au chiffre corrigé
	brut	corrigé	créatinine	ac. aminés	NH ³		
	cm ³ N/10	cm ³ N/10	cm ³ N/10	cm ³ N/10	cm ³ N/10	cm ³ N/10	
A 930 cm ³	580	434,7	66,0	55,2	24,1	145,3	33,4
B 1.250 cm ³	572	397,2	98,5	52,8	23,5	174,8	44,0
C 1.720 cm ³	424	287,5	79,2	43,2	14,1	136,5	47,4

L'examen des chiffres montre clairement l'importance de l'erreur en trop vis-à-vis de la légère déficience de la méthode quant au chiffre réel des acides organiques, lorsqu'on n'effectue aucune correction au chiffre brut fourni. Cette importance avait d'ailleurs été signalée par Laura Mc Laughlin et K. Blunt [40], qui avaient constaté que l'erreur pouvait atteindre la moitié du chiffre obtenu. De plus, ces trois exemples établissent à eux seuls un fait qu'une grande quan-

tité de dosages nous ont confirmé, à savoir que l'erreur en excès n'était pas due seulement à la créatinine, aux acides aminés et à l'ammoniaque. En effet, la valeur de la correction à établir pour ces trois corps ne subit pas de grosses variations en valeur absolue, mais augmente relativement au chiffre d'acidité organique diminué de cette correction, et d'une façon très nette, à mesure que la concentration des urines examinées diminue. La conséquence, à la fois logique et expérimentale, d'un tel fait est que le chiffre des acides organiques corrigé est beaucoup plus près de la réalité quand il s'agit d'urines de faible concentration; la cause ne peut s'en trouver que dans la présence de corps venant troubler le dosage par un effet tampon, corps dont la masse et le pouvoir sont d'autant plus considérables que l'urine examinée est plus concentrée. Nous verrons d'ailleurs plus loin la confirmation de cette assertion; pour l'instant, nous pouvons la rapprocher du fait expérimental signalé par Greenwald, que nous avons examiné antérieurement.

En résumé, les méthodes de titration directe des acides organiques suivant la gamme de pH comprise entre 8 et 2,7 s'avèrent comme totalement dénuées de précision; celle de Greenwald paraît donner les chiffres les plus corrects, cependant entachés de l'erreur par défaut provenant de ce que tous les acides organiques ne sont pas titrés intégralement (certains même, tels que les acides formique et hippurique, pour 90 p. 100 seulement), et que ceux à sels de calcium insoluble (oxalique) ne le sont pas du tout. Cette modification risque de conduire alors à une erreur par défaut, ainsi qu'il ressort d'ailleurs d'un travail de Widmark [68].

LES MÉTHODES PAR EXTRACTION.

Le deuxième groupe comprend les méthodes instituées par Desgrez et Polonowsky [21] et par Widmark [67]. Ces dernières sont basées sur le fait que, l'acide urique et les acides

oxyprotéiques de Dombrowsky mis à part, tous les acides organiques rencontrés normalement dans l'urine, et dont la liste a été donnée plus haut, sont solubles à divers titres, mais assez facilement, dans l'éther. On peut donc les extraire de l'urine à l'aide de ce dernier liquide, à condition de les avoir au préalable libérés de leurs combinaisons salines par une acidification suffisante par un acide minéral fort, insoluble dans l'oxyde d'éthyle.

La méthode de Desgrez et Polonowsky n'est pas à proprement parler une méthode de titration des acides organiques, les auteurs ayant spécifié qu'elle « permet la détermination du carboxyle urinaire, non accompagné dans la même molécule du groupement NH_2 capable de le saturer après désamination, et du poids de molécule afférent à chaque carboxyle ». On voit cependant par cela que la question est nettement posée, et la signification du chiffre obtenu parfaitement définie. Les auteurs ont utilisé la technique suivante : 100 cm^3 d'urine, prélevés sur l'émission totale des vingt-quatre heures, sont évaporés à siccité, au bain-marie, après alcalinisation par le carbonate de sodium. Le résidu, intimement mélangé à du sable pur imbibé d'un léger excès d'acide phosphorique, est épuisé par l'éther anhydre contenant 1 p. 100 d'alcool, dans l'appareil de Louise, pendant dix heures. La solution éthérée, qui ne contient pas d'acide urique, peut être traitée par une quantité connue de HONa normale dont on titre l'excès par l'acide sulfurique normal. Mais la présence inévitable de l'acide chlorhydrique, libéré des chlorures par l'acide phosphorique et entraîné dans la solution éthérée, fait préférer, pour terminer le dosage, l'isolement des acides sous forme de leurs sels de baryum, dont les uns sont solubles, et les autres insolubles dans l'eau. Ceci présente l'avantage de fournir une évaluation du poids moléculaire des corps dont on mesure par ailleurs l'acidité globale.

On voit que la méthode est ici, à l'encontre de la précédente, d'une grande spécificité : en dehors de l'acide chlorhy-

drique, dont la titration en vue de la correction à faire pourrait à la rigueur être effectuée, il n'y a que les acides organiques urinaires susceptibles d'être trouvés dans l'extrait éthéré et décelés quantitativement par un titrage acidimétrique de ce dernier, avec toutefois une petite quantité de phénols et d'autres corps extractifs, que l'addition d'alcool à l'éther d'épuisement a dissous. De plus, l'acide urique se trouve éliminé du chiffre d'acidité obtenu, ce qui, étant donné son métabolisme spécial et son dosage séparé, loin d'être un inconvénient, constitue au contraire un avantage sérieux. Cependant la méthode nécessite des manipulations très longues, évaporation, extraction de dix heures, et la correction nécessaire à la présence de l'acide chlorhydrique libéré des chlorures.

La titration des acides organiques urinaires par la méthode de Widmark est une application du nouveau procédé d'extraction « en berceau » imaginé par cet auteur [66]. Cette extraction s'effectue dans un appareil spécial, qui permet à un solvant approprié de courir entre la solution à extraire et une solution susceptible d'absorber la substance extraite sous une forme insoluble dans le solvant. Cet appareil est constitué par deux boules à décanter réunies par un large tube de communication. Le liquide à extraire (solution émettante) est versé dans l'une, tandis que l'autre reçoit le liquide destiné à absorber la substance extraite (solution recevante). Après avoir versé le solvant en quantité suffisante pour qu'il atteigne le bord du tube de communication, on place l'appareil dans un berceau actionné par un moteur, pour qu'il puisse être bercé lentement dans le sens de la longueur. Le solvant court entre les deux liquides, qui se trouvent, chacun dans sa boule, en état de mouvement continu, tout en ne s'entremêlant pas, et la substance, libérée de la solution émettante, passe dans la solution recevante.

L'application à la détermination des acides organiques de l'urine a été établie ainsi par Widmark :

On place dans le récipient émetteur 20 cm³ d'urine et 5 cm³ d'acide sulfurique 5N; en cas d'acidose, les quantités sont ramenées respectivement à 10 cm³ et 3 cm³; dans le récipient récepteur, on place 30 cm³ de lessive d'hydroxyde de sodium 0,065 N, exempt de CO² et contenue dans un flacon permettant les prélèvements à l'abri de l'air. On ajoute 350 cm³ d'éther éthylique exempt d'alcool, pas absolument anhydre mais neutre, et dont l'auteur indique avec soin la vérification; puis l'extraction est poursuivie pendant vingt-quatre heures. La solution alcaline est additionnée après transvasement dans un Erlenmeyer de 30 cm³ d'acide chlorhydrique 0,07 N et de 30 cm³ d'eau ayant servi à laver, en trois fois, l'éther dans le récipient, et portée quinze minutes à ébullition au réfrigérant à reflux pour chasser le gaz carbonique. Après refroidissement, on titre avec la liqueur d'hydroxyde de sodium décimale en présence de phtaléine. Le chiffre obtenu est diminué du chiffre de l'épreuve à blanc (extraction identique de 5 cm³ de SO⁴H² 5N dilué à 25 cm³) et la quantité des acides organiques exprimée en milliéquivalents par jour, 1 cm³ de HONa N/10 correspondant à 0,1 milliéquivalent d'acide.

Les chiffres ainsi obtenus par Widmark pour les acides organiques éliminés en vingt-quatre heures par un sujet normal, soumis à un régime mixte se placent entre 20 et 50 milliéquivalents, soit 200 à 500 cm³ N/10.

L'auteur a enfin étudié comparativement les chiffres fournis par un certain nombre d'urines par sa méthode et par celle de van Slyke et Palmer, avec correction de la créatinine. L'extraction à l'éther lui a ainsi fourni une moyenne de 52,9 p. 100 de l'acidité déterminée au procédé direct corrigé.

Si, au point de vue spécificité et précision des résultats obtenus, un tel dosage est à peu près à l'abri de toute critique et ne nécessite aucune explication, par contre sa mise en œuvre présente des difficultés telles qu'elles la rendent impraticable pour un laboratoire non spécialement outillé; de plus,

les manipulations sont longues et délicates; vingt-quatre heures d'extraction, nécessité de se débarrasser du gaz carbonique. Cette méthode voit donc son emploi réservé à un nombre fort restreint de laboratoires.

MICROMÉTHODE PAR EXTRACTION A L'ÉTHER.

Cherchant à mettre à profit les avantages indiscutables de l'extraction préalable des acides organiques à l'aide de l'éther sur la titration directe, nous avons pu réaliser cette extraction d'une manière suffisamment rapide et la faire suivre d'un dosage acidimétrique assez rigoureux pour établir une méthode facile à mettre en œuvre sans aucun outillage spécial, pouvant être réalisée en une heure trois quarts environ et ne nécessitant que quelques centimètres cubes d'urine.

Principe. — La méthode consiste à déplacer, dans une petite quantité d'urine, au préalable saturée par du sulfate d'ammoniaque, les acides organiques combinés, au moyen de l'acide sulfurique; à les entraîner, avec ceux qui pouvaient être déjà libres dans l'urine, à l'aide de l'éther sulfurique et à les doser par simple titrage acidimétrique de ce dernier.

Appareillage. — C'est celui utilisé par Clausen [14] pour l'extraction de l'acide lactique, et légèrement modifié, en vue de rendre sa construction plus facile; la disposition, très simple, en est clairement indiquée par la figure 1 : B est un ballon de Kjeldahl de 200 cm³ en verre Pyrex; R un réfrigérant à reflux adapté au ballon au moyen d'un bouchon de caoutchouc; T un tube de verre de 14 à 15 centimètres de long sur 8 millimètres de diamètre environ, légèrement évasé et muni d'un bec à son orifice; E un tube à entonnoir de 24 centimètres de long environ et dont la tige, offrant un orifice latéral de 1 millimètre, situé tout à son extrémité, doit être d'un calibre ainsi déterminé : plongée jusqu'au fond du tube T contenant 2 cm³ 7 d'eau (volume total du liquide à extraire), et maintenue vide par obturation, à l'aide du doigt, du godet

de l'entonnoir, le liquide devra faire dans le tube T une colonne annulaire de 10 à 11 centimètres. Ce tube T est engagé dans l'œillet terminal d'un fil de cuivre souple F, que l'on coince entre le col du ballon et le bouchon.

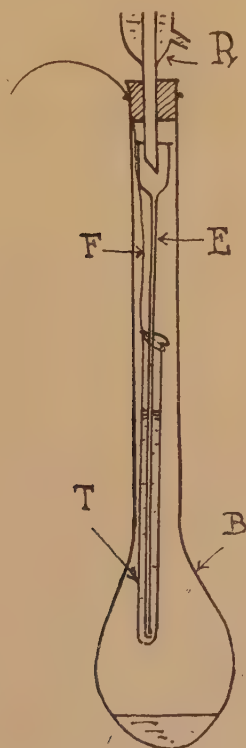


FIG. 1.

Technique. — On place dans le ballon B 40 cm³ d'éther éthylique bien neutre et exempt d'alcool; dans le tube T, mesurer exactement 2 cm³ d'urine, que l'on sature avec 1 g. 20 de sulfate d'ammonium pur pulvérisé, en mélangeant avec la tige de l'entonnoir. Après dissolution, ajouter 6 gouttes d'acide sulfurique concentré pur et remplacer l'entonnoir librement dans le tube T. On introduit le tout dans le ballon B en amenant, après ajustement du bouchon, le tube à déver-

sement du réfrigérant R à plonger légèrement dans le godet de l'entonnoir, en tirant sur le fil F. Plonger le tiers environ de la partie renflée du ballon dans l'eau d'un bain-marie portée sensiblement à 70 degrés. L'éther vaporisé est condensé par le réfrigérant, qui le déverse dans l'entonnoir, dont la tige l'amène à la partie inférieure du liquide à extraire, à travers lequel il remonte en bulles, emplît la partie supérieure du tube T et se déverse par son bec, pour recommencer le même cycle.

L'extraction est terminée en une heure et demie. Déboucher le ballon et en retirer l'appareil à extraction. Le tube T est débarrassé du tube à entonnoir, et la majeure partie de l'éther surnageant qu'il contient ajoutée au contenu du ballon, par décantation effectuée avec précaution. Ce dernier est rapidement refroidi sous courant d'eau et l'éther versé dans un des tubes de verre construits pour le dosage colorimétrique de NH_3 au réactif de Nessler dans les eaux, bouchant à l'émeri, d'une capacité de 70 cm^3 environ, et que l'on aura marqué d'un trait de jauge à 20 cm^3 . On y joint 10 cm^3 d'éther, avec lesquels on aura soigneusement rincé les parois du ballon, puis 8 à 10 cm^3 d'eau distillée neutre, 1 cm^3 d'une solution de rouge de crésol (obtenue en dissolvant 0 g. 02 de ce corps dans 54 cm^3 d'alcool à 90 degrés, y ajoutant 46 cm^3 d'eau et quelques gouttes de lessive diluée d'hydroxyde de sodium, jusqu'à sensibilisation de la teinte, vers l'orangé), et, au moyen d'une burette, une solution d'hydroxyde de sodium cinquantième-normale, en agitant après chaque affusion de quelques gouttes, jusqu'à virage net de l'indicateur (au violet). Supposons qu'on ait employé, pour arriver à ce résultat, 4 cm^3 2 de liqueur alcaline; verser dans le tube cette liqueur jusqu'au trait 5 de la burette exactement et agiter énergiquement le tube pendant trois ou quatre minutes. Après séparation de la partie aqueuse, ce qui est toujours très rapide, on amène celle-ci légèrement au-dessous du trait de jauge de 20 cm^3 avec de l'eau distillée neutre, et on verse, d'une burette graduée en vingtièmes de centimètre cube, une solu-

tion d'acide sulfurique centinormale, jusqu'à obtention d'une teinte semblable à celle d'un étalon de pH 8,2, placé dans un tube de même diamètre que celui servant au dosage et bouché au liège paraffiné. Cet étalon, constitué en mélangeant

- 5 cm³ de solution M/5 d'acide borique;
- 5 cm³ de solution M/5 de chlorure de potassium;
- 4 cm³ 18 de solution N/10 d'hydroxyde de sodium;
- 1 cm³ de solution de rouge de crésol,

et amenant à 20 cm³ avec de l'eau bidistillée, se conserve parfaitement bien pendant des mois si l'on a soin d'ajouter, avant de boucher le tube où il est contenu, 2 gouttes de toluène. S'il a fallu, pour revenir à pH 8,2, 1 cm³ 15 de SO⁴H² N/100, les acides organiques de l'urine examinée, exprimés en centimètres cubes de liqueur décijnormale par litre, seront :

$$\left[5 - \left(\frac{\times 1.15}{2} + t \right) \right] \times 100.$$

t étant la valeur d'un témoin déterminé une fois pour toutes, comme il sera dit plus loin.

Etude critique. — Sont dosés par cette méthode tous les acides organiques que l'on peut rencontrer dans l'urine, dont la liste a été donnée p. 43, sauf l'acide urique; les chiffres obtenus ont d'ailleurs la même signification que ceux de Desgrez et Polonowsky et de Widmark.

Je me suis assuré que, dans les conditions de l'extraction, les chlorures urinaires et les acides aminés n'étaient pas susceptibles de libérer leurs radicaux acides; étant donné la concentration acide, le rôle protecteur du sulfate d'ammonium qui sature le liquide, la faible température de ce dernier pendant l'extraction (au-dessous du point d'ébullition de l'éther : 35 degrés), aucune hydrolyse des amino-acides et des phénols conjugués et de tout autre corps susceptible de fournir des acides, n'est possible pendant la durée de l'extraction. Seules des traces de chlorures et de sulfates sont décelées dans la

liqueur obtenue en agitant l'éther extractif avec quelques centimètres cubes de solution sodique diluée.

La seule cause d'erreur en excès provient de la très petite quantité de phénols libres extraits (de 73 à 237 mg. par litre, d'après Marenzi [47]), et dont la capacité de saturation basique, mesurée jusqu'à pH 8,2 doit être très faible.

La détermination de la valeur d'un témoin est indispensable; elle représente l'erreur de base, ou acidité provenant de l'éther, du sulfate d'ammonium, des traces d'acide sulfurique entraînées. L'éther employé doit être aussi pur que possible, neutre et exempt d'alcool (éther redistillé sur sodium), mais pas nécessairement anhydre. L'expérience témoin consiste en l'extraction d'une solution contenant par litre :

Urée.	20 g.
Chlorure de sodium	10 g.
Phosphate monoacide de sodium	5 g.

et additionnée, pour 2 cm³, de 1 g. 20 de sulfate d'ammonium et 6 gouttes d'acide sulfurique. Le chiffre trouvé pour le dosage effectué en suivant la marche indiquée constitue alors la valeur *t*, que l'on fera entrer chaque fois dans le coefficient donnant celle des acides organiques, comme il a été dit.

Des expériences de contrôle ont été effectuées en vue d'établir le temps nécessaire à l'extraction des acides organiques contenus dans les 2 cm³ d'urine et de s'assurer que la durée de quatre vingt-dix minutes est suffisante pour que l'extraction soit complète. Comme il est impossible de déterminer cette durée séparément pour chaque acide, j'ai eu recours au traitement de plusieurs urines par extractions fractionnées de quinze minutes chacune. Tous ces essais m'ayant fourni des résultats concordants, un seul suffira à indiquer la marche de l'opération; les chiffres sont rapportés au litre, et les témoins pour les durées correspondantes établis et déduits :

Après la première extraction de quinze minutes, 167 cm³ 5

N/10;

Après la deuxième, 105 cm³;

Après la troisième, 77 cm³ 5;

Après la quatrième, 40 cm³;

Après la cinquième, 10 cm³;

Après la sixième, 5 cm³.

Une septième et une huitième extraction n'ont donné qu'une acidité inférieure à une goutte de solution centinormale. La totalité de l'acidité organique étant de 405 cm³ N/10, on voit que plus de 95 p. 100 de cette acidité est extraite au bout

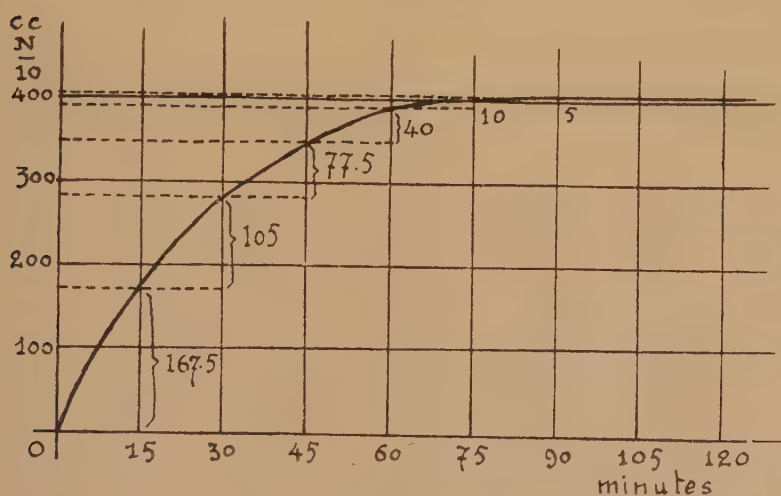


FIG. 2.

d'une heure. La courbe représentative (fig. 2) indique d'ailleurs clairement la marche de l'opération. Une autre urine a fourni un chiffre d'acidité organique de 200 cm³ N/10 par litre au bout d'une heure et demie d'extraction; une autre prise, soumise à cette dernière pendant quatre heures, a donné 205 cm³, légère plus-value de 2,5 p. 100, à laquelle ont pu contribuer les erreurs de mesure et d'expérience, et qui reste dans les limites de celles-ci.

Enfin j'ai recherché si une quantité connue d'un acide organique ajoutée à une urine était intégralement retrouvée. J'ai choisi l'acide hippurique, peu soluble dans l'éther, et en ai

ajouté 4 mg. S_2 représentant ainsi 246 cm^3 de liqueur décimale par litre, à 2 cm^3 d'urine qu'un dosage précédent m'avait montré contenir $215 \text{ cm}^3 \text{ N}/10$ d'acides organiques totaux par litre. L'extraction de ces 2 cm^3 additionnés d'acide hippurique a fourni un chiffre de $465 \text{ cm}^3 \text{ N}/10$ au lieu de 461 cm^3 calculés (215 existants plus 246 introduits).

Quelques points méritent encore d'être examinés. Il faut veiller avec soin à ce que la température du bain-marie se maintienne entre 68 et 70 degrés; toute chute de température ayant pour effet de ralentir la vitesse de vaporisation de l'éther, et la vitesse d'extraction étant proportionnelle à la quantité d'éther qui traverse le liquide à extraire pendant un temps donné, tout se passe comme si l'on réduisait la durée de l'extraction. D'autre part, il n'y a aucun intérêt à dépasser 70 degrés, le liquide à extraire s'échaufferait plus vite que l'éther ne le refroidit, et ce dernier produirait des bulles de vapeur risquant d'entraîner le débordement de la liqueur acide dans le ballon et la remise en œuvre de dosage.

Si l'urine contient de l'albumine, il convient de l'en débarrasser au préalable, car le précipité protidique qui se formerait lors de l'acidification par l'acide sulfurique adsorberait une certaine quantité d'acides organiques, en raison du pH faible du milieu [14]. La désalbumination sera faite au moyen de l'acide tungstique, en ajoutant à 5 cm^3 d'urine $0 \text{ cm}^3 \text{ S}$ d'une solution à $10 \text{ p. } 100$ de tungstate de sodium et $0 \text{ cm}^3 \text{ S}$ d'acide sulfurique en solution normale. Après centrifugation, on opère sur 2 cm^3 du liquide clair et on multiplie par $1,2$ le chiffre des acides organiques trouvé.

La précision résulte de ce que le dosage est effectué par titration en retour de l'excès (qui devra toujours dépasser $0 \text{ cm}^3 \text{ S}$) de liqueur alcaline agitée avec l'extrait éthéré acide; dans ces conditions, aucun équilibre de partage ne peut avoir lieu entre l'éther et la liqueur aqueuse, comme dans une titration directe, ce qui est prouvé par la stabilité du virage obtenu. Par comparaison avec l'étalon de pH $8,2$, on ne risque pas de pénétrer dans la zone de virage des acides orga-

niques les plus faibles; l'égalité des deux teintes est amenée par une goutte de liqueur acide centinormale et elle disparaît par une autre goutte en excès.

Sur un certain nombre d'urines, j'ai effectué le dosage comparatif des acides organiques totaux par la méthode que je viens de décrire et par celle de van Slyke et Palmer, suivant les indications de Goiffon et Nepveux. Les trois exemples utilisés précédemment nous suffiront à tirer de ces comparaisons les renseignements que l'ensemble des dosages m'a d'ailleurs confirmés.

Urines. Volumé par 24 heures.	Acidité organique Van Slyke-Palmer		Acidité organique Van Slyke corrigé diminué de l'acide urique	Acidité organique par extraction à l'éther	Pourcentage extrait à l'éther sur Van Slyke	
	brut	corrigé			brut	corrigé
A	cm ³ N/10	cm ³ N/10	cm ³ N/10	cm ³ N/10		
920 cm ³ B	380	434,7	393	195	33,6	50
1.250 cm ³ C	572	397,2	347,5	205	35,8	59
1.720 cm ³ ...	424	287,5	258,5	180	42,4	70

Ces chiffres sont, en effet, situés très près des moyennes que l'on obtient avec ceux fournis par des urines un peu concentrées, de concentration normale, et émises sous l'influence d'une légère diurèse; nous avons déjà fait remarquer que plus cette dernière est grande et moins le chiffre des acides organiques donné par le procédé de van Slyke et Palmer est entaché d'erreur relative; cela concorde exactement avec la base établie par le chiffre d'extraction à l'éther, lequel peut atteindre plus de 70 p. 100 de celui de van Slyke corrigé, alors qu'il n'en représente que la moitié environ pour les urines concentrées. Ceci vient en accord avec les faits observés par Greenwald et les considérations critiques précédemment exposées.

En conséquence, les chiffres obtenus à l'aide de cette micro-méthode sont du même ordre de grandeur que ceux de

Greenwald, rapportés plus haut, et exactement superposables à ceux donnés par Widmark, c'est-à-dire que les acides organiques totaux éliminés en vingt-quatre heures par des sujets sains se placent entre 200 et 400 cm³ de liqueur décinormale.

Cette excrétion varie d'ailleurs avec chaque sujet et, pour un même individu, est fonction d'un nombre assez grand de facteurs, parmi lesquels se placent la nature de l'alimentation, la diurèse, les conditions d'exercice physique, etc. L'étude de ces variations fera l'objet d'un chapitre spécial

CHAPITRE II

L'ACIDITE ORGANIQUE URINAIRE LIBRE

Tous les acides organiques, dont nous venons de déterminer la quantité globale existant dans l'urine, possèdent une constante de dissociation très faible. Si nous examinons leurs courbes de titration ou simplement le fait qui sert de base à leur méthode de titration suivant van Slyke et Palmer, c'est-à-dire leur entière liberté à pH 2,7 et leur presque complète saturation à pH 8 (qui devient totale à pH 8,2), nous voyons que les variations de concentration ionique nécessaires à leur libération se placent, du moins en grande partie, dans les limites de pH entre lesquelles varie la réaction ionique de l'urine, laquelle peut aller de PH 4,8 (Guillaumin [31]), ou même 4,523 (Henderson et Spiro [33]), jusqu'à pH 8 (Marshall [48]). Ceci nous amène tout naturellement à examiner le rôle que les acides organiques jouent dans l'acidité titrable de l'urine, rôle qui a été le point de départ de nos connaissances à leur sujet.

La quantité globale des acides organiques existant à l'état libre dans l'urine prend alors le nom d'*acidité organique libre totale*; pour fixer cette quantité, il est nécessaire de déterminer :

- 1° l'acidité titrable totale (minérale + organique);
- 2° l'acidité minérale, représentée en pratique par l'acidité phosphatique;
- 3° l'acidité ionique, qui permet la répartition exacte de cette dernière.

Des analyses appropriées (Denigès [19], etc.) ont établi que, parmi les corps contribuant à donner à l'urine son acidité, les minéraux tenaient une place prépondérante; que, dans ce groupe, les phosphates monométalliques ne laissaient qu'une place fort restreinte aux autres sels minéraux acides et à l'acide carbonique, les phosphates bimétalliques étant considérés comme neutres en raison du fait que leur acidité, due au dernier hydrogène de PO_4H^3 , ne commence à être saturée qu'au delà de pH 9, valeur déjà sensiblement plus élevée que la neutralité. Il reste cependant, même à l'état physiologique, une certaine part de cette acidité, due à la présence de petites quantités de nombreux acides organiques libres et aussi à celle des acides organiques polyvalents, dont une partie seulement des fonctions acides est saturée par une base, fixe ou volatile. Tous ces corps acides sont, avec la masse importante des corps tampons de l'urine, en état d'équilibre, dont le pH indique la résultante, et dans des proportions régies par leur constante de dissociation en fonction de cette acidité ionique.

Il est dès lors facile de voir que la part revenant à chaque groupe de substances dans l'acidité totale de l'urine est fort difficile à déterminer. La notion quantitative d'acidité organique libre a pris naissance au cours de l'établissement de procédés d'investigation destinés à effectuer cette répartition. De ces divers moyens d'investigation, nous ne retiendrons que celui qui, à l'heure actuelle et du point de vue où nous nous plaçons, est seul susceptible de fournir des résultats dont l'interprétation soit nette. Ce moyen est le dosage, à l'aide d'une liqueur alcaline titrée et d'un indicateur dont le choix, de première importance, a soulevé de nombreuses controverses, de l'acidité brute, totale et réelle de l'urine (que certains auteurs qualifient encore d'apparente), en y faisant entrer nécessairement la totalité des sels acides, ce qui implique un point de virage assez élevé, situé au moins vers pH 8,2, donné par la phtaléine du phénol; encore verrons-nous plus loin que, même à ce pH, la totalité des phosphates

monométalliques n'est pas saturée. Connaissant, d'autre part, la quantité d'ions phosphoriques existant dans cette urine, on constate, en admettant que tous ces ions soient à l'état monométallique, ce qui est inexact, que cette acidité phosphatique ne suffit généralement pas à classer l'acidité de titration, une commune mesure ayant été employée pour leur expression. On a été ainsi conduit à donner à la différence constatée le nom d'*acidité organique libre* et à lui assigner une valeur minima par le calcul de cette différence.

L'idée première en revient à Blarez [10], qui s'exprime ainsi : « Si le chiffre d'acidité en SO_4H^2 est à peu près égal, ou inférieur, à la quantité d'acide phosphorique P_2O_5 dosée directement, les choses sont normales; si cette proportion est dépassée, c'est qu'il y aura dans l'urine des acides organiques libres : lactique, hippurique, acides gras en excès, car, à l'état normal, il y en a très peu... Quoi qu'il en soit, il y a lieu d'attirer l'attention sur cet excès d'acidité totale et cette présence d'acides organiques libres. » Et Mestrezat [51] met au point un procédé quantitatif de détermination de la valeur minima des acides organiques libres, auxquels il ajoute d'ailleurs l'acide carbonique, par le calcul, suivant Blarez, de la différence entre l'acidité apparente (corrigée de NH_3 et de Ca) et l'acidité phosphatique, le tout exprimé en acide sulfurique :

Grammes d'acides organiques libres dosables à la phthaléine
en SO_4H^2 par litre = Acidité apparente corrigée (en SO_4H^2
par litre) — grammes de P_2O_5 par litre $\times 0,69$.

Grimbert et Morel [29] ont également tenu compte de l'acidité organique libre lorsqu'ils ont établi leur procédé de dosage de l'acidité « réelle » urinaire, qui comprend les opérations suivantes :

L'urine est, au préalable, décalcifiée pour éviter la perturbation apportée dans le dosage acidimétrique des phosphates par les sels de calcium, en remplaçant quantitativement ceux-ci, sans changer

l'acidité urinaire, par des sels de potassium, au moyen d'oxalate de potassium pulvérisé, pur et neutre. L'acidité est ensuite titrée exactement à la phtaléine à l'aide d'une liqueur sodique décimale et corrigée de la perturbation retardatrice apportée par les sels ammoniacaux par la détermination de ceux-ci à l'aide de la formol-titration d'après Ronchèse.

D'autre part, les phosphates sont dosés à la liqueur d'urane.

Si n est le nombre corrigé de centimètres cubes de solution sodique nécessaires à la saturation à la phtaléine de 10 cm³ d'urine décalcifiée, l'acidité réelle R , exprimée en PO₄H³ considéré comme monovalent ($1/3$ de PO₄H³ = 32,6), sera, rapportée au litre, de :

$$R = n \times 0.00326 \times 100$$

Si P est le chiffre des phosphates rapporté à P₂O₅ considéré comme monovalent ($1/2$ de P₂O₅ = 71), l'acidité phosphatique p , c'est-à-dire que présenterait l'urine si tout son acide phosphorique se trouvait à l'état monométallique, sera :

$$p = P \times 0.459$$

Ces auteurs considèrent alors trois cas :

1° L'acidité phosphatique p est inférieure à l'acidité réelle R ; dans ce cas, la différence entre l'acidité réelle R et l'acidité phosphatique p représentera l'acidité due aux acides organiques :

$$a = R - p.$$

L'urine ne peut alors contenir de phosphates disodiques, mais seulement des phosphates monosodiques, dont la teneur par litre sera déterminée en multipliant l'acidité phosphatique par le facteur 3,680.

2° L'acidité phosphatique est égale à l'acidité réelle; dans ce cas, l'urine ne renferme ni phosphates disodiques ni acides organiques libres, et $p = R$.

3° L'acidité phosphatique est supérieure à l'acidité réelle. Dans ce cas, il ne peut y avoir d'acidité organique; l'acidité réelle R correspond nécessairement aux phosphates monosodiques et l'excès d'acidité phosphatique est dû à la présence de phosphates n'agis-

sant pas sur la phtaléine, c'est-à-dire de phosphates disodiques, acidité d'ailleurs purement théorique et qui est représentée par la différence entre l'acidité phosphatique et l'acidité réelle. Si on représente l'acidité phosphatique due aux phosphates monosodiques par la lettre m et l'acidité théorique due aux phosphates disodiques par la lettre d , on aura :

$$m = R, \text{ et } d = p - R.$$

La teneur de l'urine en phosphates mono et disodiques sera donnée par :

$$\text{PO}_4\text{NaH}_2 = R \times 3,680, \text{ et } \text{PO}_4\text{Na}_2\text{H} = d \times 4,356.$$

Outre le fait peu logique et peu pratique d'exprimer l'acidité organique en acide sulfurique ou phosphorique, il est évident que ces méthodes ne sont susceptibles de donner que des valeurs de l'acidité organique libre la plupart du temps fort inexactes, étant basées sur la convention arbitraire et erronée que les phosphates urinaires sont presque toujours à l'état monométallique. Or il n'en est rien.

Il est indispensable, pour déterminer la part qui revient aux acides organiques libres dans l'acidité urinaire totale, de connaître exactement la répartition des ions phosphoriques en fonction du pH. C'est sur cette base que nous avons établi notre procédé de dosage des acides organiques libres.

Nous venons de voir que l'opinion généralement admise avant que la théorie et les applications de la dissociation ionique se fassent jour était que les phosphates urinaires se trouvaient à l'état monométallique et concouraient ainsi à former la presque totalité de l'acidité de l'urine. Aussi, lorsque, en 1923, Lematte et Mlle Delacroix [42] firent connaître le résultat de travaux établissant, selon eux, l'existence d'une forte proportion de phosphates bimétalliques dans l'urine normale, en se basant sur le fait qu'une solution de chlorure de baryum ajoutée à un mélange de phosphates mono et bimétalliques en solution pure ne précipite que ces derniers, fait dont ils avaient admis l'exactitude dans le cas où ces

phosphates se trouvaient en solution dans ce milieu complexe qu'est l'urine, de vives discussions se sont élevées. C'est ainsi que Mestrezat dit [49] :

« Dans l'hypothèse de la nature monophosphatique de l'acidité urinaire, on ne peut, en effet, manquer d'être frappé du fait suivant, savoir : que, lorsque, partant de l'acidité directe trouvée, encore appelée acidité à la phtaléine, on calcule le poids de phosphates monométalliques qui lui correspondrait, on trouve, à peu de chose près, le chiffre de P_2O_5 dosé volumétriquement ou pondéralement. Inversement, en partant de P_2O_5 , on définit, à 0,20 près (acidité organique de Blarez), l'acidité urinaire. Si l'on songe à la variabilité du chiffre des phosphates avec le régime, une pareille concordance n'est plus une coïncidence, et on comprend qu'elle ait entraîné, jusqu'ici, la conviction. Jusqu'à quel point peut-on admettre, d'autre part, que ces phosphates dimétalliques puissent exister dans un milieu d'une acidité supérieure à celle qui correspondrait au terme des phosphates monométalliques? »

Et encore [50] :

« On peut concevoir que la précipitation des phosphates dimétalliques en présence de phosphates monométalliques par le chlorure de baryum dans un milieu qui ne renferme que ces sels soit pondéralement possible, mais cela n'implique nullement qu'il en soit de même dans l'urine. Le chlorure de baryum, qui ne précipite pas une solution de phosphates monométalliques quand il lui est ajouté seul, précipitera de cette même solution un phosphate dibarytique insoluble en présence de sels susceptibles de fournir, par double décomposition, le métal de ce diphosphate (loi de Berthollet). Cette double décomposition est inévitable; l'expérience est facile à réaliser, et je l'ai faite dans une précédente séance. Elle n'implique pas, comme le voudrait Lematte, que le phosphate précipité par addition de chlorure de baryum préexiste à cette addition. Or, les sels organiques (acétates, lactates, succinates) existent dans l'urine. Le fait donc d'y précipiter, par le chlorure de baryum, un diphosphate barytique ne permet en aucune façon de penser que ceux-ci soient préformés, alors qu'il y a de sérieuses raisons de

penser autrement. Je maintiens entièrement l'opposition que je fais aux conclusions de M. Lematte, la technique qu'il utilise étant, à mon sens, fausse dans son principe. »

On voit, par cet exposé très juste et très clair, qu'une investigation purement chimique est impuissante à éclairer le problème de la répartition des ions phosphoriques urinaires.

Il est pourtant à considérer qu'à cette époque la détermination du pH avait, par la connaissance de la dissociation ionique, permis depuis longtemps à Sørensen (1912), à Clark et Lubs (1916), etc., d'établir la courbe de titration de l'acide phosphorique, de voir que son second hydrogène, entièrement libre à pH 4,4, était complètement saturé vers pH 9, et de proposer justement, comme solutions tampons de pH compris vers la partie centrale de l'échelle ainsi limitée, des mélanges en proportions variables de solutions de phosphates mono et bimétalliques. De plus, alors que dans la méthode chimique employée par Lematte, on ne peut assimiler les résultats obtenus en solution pure à ceux que l'on obtient dans ce milieu si complexe qu'est l'urine, il est ici parfaitement exact de supposer que les phosphates de l'urine se répartissent, en fonction de l'acidité ionique et de leur constante de dissociation, de la même façon qu'en solution pure.

Ce point avait cependant été l'objet d'appréciations différentes de la part de Guillaumin, Bessonoff et Wurmser [30]. Guillaumin, qui, à la suite de Gamble [25], avait pensé que les méthodes physico-chimiques, et en particulier la mesure du pH, étaient susceptibles de résoudre de tels problèmes, a étudié l'influence des sels neutres sur la répartition des phosphates. Il avait constaté que, si l'addition de chlorures, nitrates, sulfates neutres, était sans effet sur cette répartition (c'est-à-dire ne modifiait pas l'état d'ionisation du milieu), les acétates alcalins avaient par contre une influence. Il pensait s'en assurer en ajoutant, à 40 cm³ de solution de phosphate acide de potassium en concentration M/15, présentant un pH de 4,55, 0 g. 25 d'acétate de sodium. Le pH s'élevait

alors à 6, montrant que 46 p. 100 de l'acide phosphorique était passé à l'état monoacide. Or ces 0 g. 25 d'acétate de sodium, dissous dans 10 cm³ d'eau, présentent un pH de 7,45. La réaction ionique finale ne saurait faire autrement que se stabiliser vers une valeur intermédiaire, qui peut, d'ailleurs, être calculée en fonction des pH et des pouvoirs tampons des deux solutions; cela entraîne fatalement la régression d'une certaine quantité des ions phosphoriques à l'état bimétallique. Si cela n'a pas lieu lorsqu'on ajoute à la solution phosphatique un chlorure, nitrate ou sulfate neutre, c'est parce que ces sels ne présentent aucun pouvoir tampon.

Pour se convaincre de l'influence totalement nulle exercée par les acétates sur la répartition des phosphates, il suffit de préparer une solution d'acétate de sodium de pH 7,5 et une solution phosphatique de même pH, contenant 48,31 de phosphate biacide de sodium et 81,69 de phosphate monoacide pour 100 de phosphates totaux, les deux étant colorées avec le même indicateur (phénolsulfonephtaléine). Le mélange en toutes proportions de ces deux solutions donne toujours un liquide de même pH 7,5. Ceci prouve que pour un pH déterminé, ou résultante physico-chimique d'une quantité de corps exerçant chacun leur action, les phosphates sont bien répartis suivant la courbe de titration du deuxième H de PO_4H_3 , quels que soient, en qualité et en quantité, les autres constituants du milieu considéré, et en particulier si ce milieu est l'urine.

MÉTHODE DE DOSAGE DE L'ACIDITÉ ORGANIQUE LIBRE.

Dès lors, les conclusions de Gamble, Guillaumin, Lesœur et Violle sont exactes, et la part de l'acidité titrable de l'urine revenant aux phosphates monométalliques peut se déterminer exactement si l'on connaît la totalité des ions phosphoriques et le pH de cette urine. C'est la connaissance de cette relation qui nous a permis d'apporter aux méthodes étudiées une modification conduisant à la détermination relativement exacte de l'acidité organique urinaire libre.

L'acidité réelle R sera déterminée exactement comme l'indiquent Grimbert et Morel : à 100 cm³ d'urine on ajoute 0 g. 50 d'oxalate de potassium, on agite vivement et on filtre sur filtre demi-dur après une demi-heure de repos. C'est l'urine ainsi décalcifiée qui servira aux déterminations suivantes :

1° *Titration à la phtaléine*. — Dans deux vases à précipité, verser 10 cm³ d'urine et 10 cm³ d'eau distillée, puis deux gouttes de solution de phtaléine. Verser dans l'un une solution sodique décinormale jusqu'à coloration rose, l'autre servant de témoin; recommencer dans l'autre vase et prendre la moyenne des deux résultats, soit N cm³.

2° *Correction*. — Mesurer dans un verre 20 cm³ de formol au demi, ajouter quelques gouttes de phtaléine et de la solution sodique N/10 à coloration rose, verser le tout dans les 10 cm³ d'urine neutralisés de l'expérience précédente. Ajouter, à l'aide de la burette graduée, HONa N/10 jusqu'à réapparition de la teinte rose. Soit N' le nombre de centimètres cubes nécessaires : N'/30 donnera le nombre de centimètres cubes qu'il faudra retrancher du chiffre obtenu dans la titration de l'acidité pour la ramener à sa valeur réelle.

L'acidité réelle R sera logiquement exprimée en centimètres cubes de liqueur décinormale par litre, d'après l'équation :

$$R = n \times 100, \quad \text{où} \quad n = N - \frac{N'}{30}$$

si n est le nombre ainsi corrigé de centimètres cubes de HONa N/10 nécessaires.

3° *Dosage de l'ion phosphorique*, à l'aide d'un procédé approprié. Le résultat sera exprimé en anhydride phosphorique, en gramme par litre. L'acidité phosphatique sera également exprimée en centimètres cubes de liqueur décinormale à l'aide de la relation :

$$A. P. = P_2O_5 \text{ (en grammes par litre)} \times 141 \text{ (1)}.$$

(1) 1 gramme d'acide phosphorique, provenant de 1/2 de P₂O₅ = 74, à l'état de phosphate monométallique, est saturé par 141 cm³ de liqueur décinormale alcaline.

Détermination du pH urinaire. — Cette détermination ne constitue pas une complication de la méthode, étant donné qu'elle est entrée dans la pratique courante. Disons seulement que si l'on opère en prenant la précaution de recueillir l'urine directement sous toluène et de la conserver jusqu'à l'analyse dans un endroit frais, on peut, au moyen des échelles d'étalons colorés, connaître cette valeur assez exactement quant à sa première décimale, ce qui est pratiquement suffisant.

Les phosphates monométalliques existant réellement dans l'urine sont alors calculés à l'aide d'un coefficient M représentant, en fonction du pH, la quantité de phosphates monométalliques pour cent de P^{2O^5} total. Des tables établissant cette proportion ont été dressées par Lescœur et Violle [44], à partir de la constante de dissociation du 2^e H de PO^4H^3 donnée par Abbott et Bray; mais ces valeurs théoriques ne correspondent pas tout à fait à celles établies expérimentalement par Clark et Lubs, et nous pensons qu'il est préférable de s'en rapporter à ces dernières. Donald D. van Slyke a donné une équation [64], dérivée de celle de Henderson, permettant de calculer le pourcentage

$$\frac{PO^4 HM^2}{P^{2O^5} \text{ total}}$$

en fonction du pH, et a pu établir la concordance presque parfaite des valeurs ainsi calculées avec les données expérimentales. C'est à l'aide de cette équation qui s'écrit :

$$pH = 6.85 + \log \frac{PO^4 HNaK}{PO^4 H^2K}$$

que nous avons dressé la table suivante :

pH	M	pH	M	pH	M	pH	M	pH	M
5,2	97,8	5,7	93,4	6,2	81,7	6,7	58,5	7,2	30,8
5,3	97,3	5,8	91,8	6,3	78,0	6,8	52,8	7,3	26,2
5,4	96,5	5,9	89,9	6,4	73,8	6,9	47,2	7,4	22,0
5,5	95,7	6,0	87,6	6,5	69,1	7,0	41,5	7,5	18,3
5,6	94,7	6,1	84,9	6,6	64,1	7,1	35,9	8,2	4,2

Connaissant le pH de l'urine, il suffit de consulter cette table pour avoir immédiatement la proportion de phosphates monométalliques y existant et leur valeur absolue, c'est-à-dire la part qu'ils prennent dans l'acidité réelle, en effectuant le calcul très simple :

$$p = P_2O_5 \text{ (en grammes par litre) } \times 141 \times M.$$

Les derniers chiffres de la table montrent qu'en dosant à pH 8,2, qui est le point de virage au rose de la phthaléine, l'acidité libre de l'urine, on a laissé de côté 4,2 p. 100 des phosphates monométalliques. La valeur de l'acidité réelle R est donc trop faible de 4 p. 100 sensiblement de ces phosphates, et on devra lui faire subir une correction additive équivalente en la représentant par :

$$R + \frac{4}{100} p^{(2)}$$

La différence entre l'acidité réelle et l'acidité phosphatique, ainsi ramenées chacune à leur juste valeur, donne alors celle de l'acidité organique libre. Cette dernière s'écrit :

$$A.O.L. = \left[R + \frac{4}{100} p \right] - p, \quad \text{soit} \quad R - 0.96 p.$$

L'exactitude des chiffres donnés par cette méthode est évidemment assez difficile à contrôler par les moyens habituellement employés dans ce genre d'opérations. Elle dépend de la précision des procédés utilisés pour la détermination des différents éléments du calcul, acidité réelle, phosphates, pH, et du soin apporté à ces déterminations. De plus, il peut arriver que les erreurs, aussi faibles soient-elles, qui se glissent inévitablement dans les opérations, ou s'ajoutent, ou se retranchent par le jeu des calculs nécessaires. C'est là l'écueil

(2) Il est bien entendu que cette acidité phosphatique n'est représentée que par les phosphates en solution dans l'urine au moment de l'analyse. Dans le cas d'urines à dépôt phosphatique, ceux qui sont ainsi insolubilisés ne prennent plus part ni à l'acidité ionique ni à l'acidité titrale de l'urine.

de toutes les méthodes indirectes, et celle-ci ne saurait faire exception à la règle. Nous avons cependant pu établir que l'erreur relative commise, calculée en supposant que les erreurs partielles apportées par chaque élément s'ajoutent, ce qui n'a lieu en somme qu'assez rarement, ne dépasse pas 5 p. 100 lorsqu'il s'agit d'une urine où tous les éléments sont voisins de la normale et ne commence à prendre de l'importance (10 p. 100) que pour les urines à pH élevé, 6,5 et au delà.

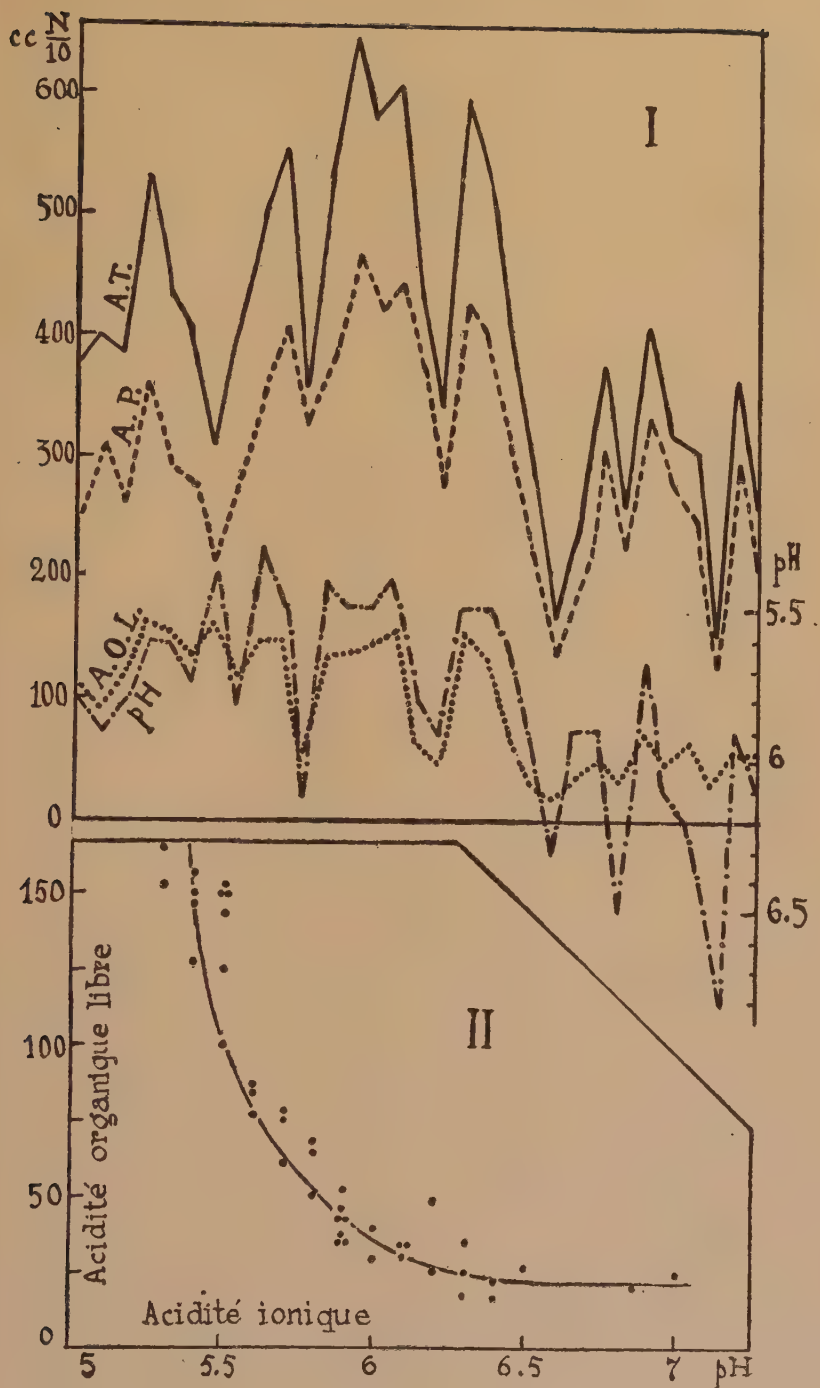
Il est intéressant de noter que les cas où les acides organiques libres ont une valeur élevée (cas pathologiques) sont ceux où leur détermination est susceptible de la plus grande précision que peut fournir la méthode.

Quoi qu'il en soit, il est certain que cette modification apporte à la méthode de Grimbert et Morel une exactitude suffisante, dont elle était totalement dépourvue (Mestrezat dit d'ailleurs des valeurs ainsi fournies : « Il ne s'agit pas d'un chiffre absolu, mais d'une valeur minima »), pour l'évaluation des acides organiques libres de l'urine.

Nous avons pu en faire la preuve en établissant la répartition de cette acidité libre, répartition que nous allons exposer.

Nous avons tout d'abord réuni dans le tableau suivant (p. 48) les chiffres d'acidité organique libre calculés suivant Grimbert et Morel d'une part (on remarquera que nous n'avons pas exprimé ces derniers en acide phosphorique, suivant ces auteurs, mais en cm³ de liqueur décinormale, pour les rendre comparables aux autres), et suivant cette méthode modifiée par nous d'autre part. Les chiffres d'acidité organique libre ainsi corrigés ne sont jamais négatifs s'ils diminuent visiblement à mesure que le pH s'élève pour tendre vers 0 pour pH 7,5, et cela quels que soient l'acidité réelle R et le taux des phosphates.

Il est même possible de se rendre compte de l'influence exercée sur le pH de l'urine par les acides organiques libres



I. A.T.=Acidité de titration totale.

A.P.=Acidité phosphatique corrigée.

A.O.L.=Acidité organique libre totale.

II. Relation entre le pH et l'acidité organique libre totale.

en examinant le graphique des points obtenus en portant en abscisses les valeurs de pH et en ordonnées celles de l'acidité organique libre totale. Ces points se placent nettement suivant la courbe tracée, du moins pour les valeurs moyennes du pH, courbe dont l'allure asymptotique montre que le pH ne saurait s'abaisser indéfiniment lorsque l'acidité croît toujours, et qu'il faut atteindre une valeur élevée de pH pour ne plus trouver d'acidité libre.

D'autre part, le seul examen des courbes respectives d'élimination en concentration par litre, de l'acidité titrable totale, de l'acidité phosphatique et de l'acidité organique libre totale, et de variation du pH, met hors de doute, par le parallélisme que ces deux dernières affectent entre elles, les relations de cause à effet qui les lient. De plus, on remarquera que lorsque la courbe du pH tend à s'écarter de celle de l'acidité organique libre, c'est pour suivre celle de l'acidité phosphatique, qui devient alors prédominante dans son action.

Néanmoins, les variations de la diurèse empêchent d'établir entre le pH et l'acidité organique libre une relation fixe, car les urines abondantes voient leur acidité diminuer, alors que le pH reste fixe, en raison de l'effet tampon, et il faudrait faire une part de plus en plus grande à l'acidité phosphatique à mesure que l'acidité organique diminue.

Urines. N°	pH	P2O5 gr.	R cm ³ N/10	R corrigée cm ³ N/10	Grimbert Morel cm ³ N/19	p corrigé cm ³ N/10	Acidité org. Grimbert Morel. cm ³ N/10	Acidité org. libre réelle. cm ³ N/10
92	5,4	2,9	525	540,8	408,9	394,6	116,1	146,2
93	5,5	3,75	635	655,2	528,7	506	106,3	149,2
94	5,5	3,2	565	582,3	451,2	431,8	113,8	150,5
95	5,4	3,3	593	610	465,3	449	129,7	161
106	5,7	2,65	410	425	373,6	349	51,4	76
96	5,8	2,9	425	440	408,9	375,3	16,1	64,7
97	5,9	2,2	325	336,2	310,2	278,8	26	57,4
107	6,1	2,45	320	331,7	345,4	293,3	0	38,4
105	6,5	2,3	250	258,9	324,3	224,1	0	34,8
109	6,85	1,95	155	160,5	274,9	137,5	0	23
91	6,9	5,2	368	381,8	733,2	346,0	0	35,8
140	7,7	0,93	10	10,4	46,5	10,5	0	0,0

Les chiffres de l'urine n° 91 ont été fournis par l'analyse de l'urine, émise au lever, d'un sujet ayant absorbé la veille au soir 4 g. de phosphate monoacide de sodium et 4 g. de carbonate acide de sodium. Sa teneur exceptionnelle en P^2O^5 , jointe à une acidité R très moyenne, laisse cependant de la place à une certaine acidité organique libre.

RÉPARTITION DE L'ACIDITÉ ORGANIQUE LIBRE.

L'ACIDITÉ ORGANIQUE LIBRE SOLUBLE DANS L'ÉTHÉR.

L'acidité organique libre de l'urine, telle que nous venons de la déterminer, représente donc la somme des corps acides autres que les phosphates monométalliques. Etant donné par ailleurs le peu d'importance des autres sels minéraux acides et de l'acide carbonique libre (les carbonates acides se comportant comme les phosphates bimétalliques), on peut dire que cette acidité est représentée par des quantités minimales et variables de tous les acides caractérisés dans l'urine, soit entièrement libres, soit partiellement saturés par des bases, fixes ou volatiles. On peut en faire deux grands groupes :

1° Acides organiques solubles dans l'éther; *

2° Acide urique.

Pour être exact, il faudrait ajouter à l'acide urique les acides organiques polyvalents à l'état de sels acides, et par suite insolubles dans l'éther.

Nous avons été ainsi conduit à nous demander dans quelle mesure la somme *acidité organique libre soluble dans l'éther* + *acide urique libre* se rapproche de l'acidité organique libre totale déterminée par la méthode indirecte précédemment établie.

Dans le but de nous rendre compte jusqu'à quel point cette supposition pouvait être réalisée, nous avons d'abord institué une méthode de dosage des acides organiques, solubles dans l'éther, de l'urine.

Pour cela, le plus simple eût été d'employer le procédé que

nous avons établi pour le dosage des acides organiques totaux par extraction à l'éther, cette extraction étant seulement effectuée sur 2 cm³ d'urine sans addition d'acide sulfurique ni de sulfate d'ammoniaque. Le titrage acidimétrique de l'éther extractif, suivant le procédé indiqué, eut conduit à une erreur relative trop importante eu égard à la faible quantité d'acides organiques libres à doser (de 20 à 80 cm³ de liqueur décinormale par litre). Dans ces conditions, nous avons jugé préférable de calculer la différence entre l'acidité titrable totale de l'urine et cette même acidité après enlèvement des acides organiques libres par l'éther.

Le mode opératoire choisi a été le suivant :

1° 10 cm³ d'urine sont décalcifiés par agitation avec 10 à 20 cg. d'oxalate de potassium pulvérisé pur et neutre; après vingt minutes de repos, filtrer sur un petit filtre dur. Prendre un tube à essais que l'on aura marqué d'un trait de jauge à 10 cm³, et y placer 2 cm³ de l'urine décalcifiée et 0 cm³ 5 de la solution de rouge de crésol (1). Dans un bloc comparateur de Walpole, disposer un étalon de pH 8,2 au rouge de crésol, placé dans un tube semblable au précédent et préparé comme il a été dit page 29; devant lui, mettre dans un tube 2 cm³ de l'urine décalcifiée étendue à 10 cm³ avec de l'eau distillée. A côté, placer le tube contenant l'urine additionnée de l'indicateur, et devant lui un tube contenant de l'eau. A l'aide d'une burette graduée en vingtièmes de cm³, faire tomber dans l'urine une solution cinquantième-normale d'hydroxyde de sodium jusqu'à obtention d'une teinte exactement semblable à celle de l'étalon, le liquide de dosage ayant été amené, vers la fin de l'opération, au trait de jauge de 10 cm³ avec de l'eau bidistillée. Le dosage de l'acidité réelle de l'uriné est ainsi effectué avec précision, car une seule goutte de liqueur sodique suffit pour influencer très nettement le virage, la comparaison des teintes se faisant

(1) Voir sa préparation p. 28.

avec toute la rigueur désirable dans le comparateur. Soit a cm³ de liqueur sodique nécessaires pour arriver à l'égalité des teintes : $a \times 100 = N =$ acidité réelle en cm³. N/10 par litre. Ce mode opératoire conduit, pour la détermination de l'acidité urinaire libre totale aux mêmes résultats que celui, à la phthaléine, décrit précédemment. Il présente l'avantage de ne pas nécessiter de correction, n'étant pas influencé par la présence des sels ammoniacaux. Nous nous sommes assuré de leur parfaite concordance à l'aide de plusieurs contrôles, dont voici l'un :

Urine décalcifiée : a) 10 cm³ du filtrat nécessitent 4 cm³ de HONa N/10 pour virer au rose de la phthaléine, puis, après addition de formol neutre, 6 cm³ de cette même liqueur; ce qui conduit à 460 cm³. N/10 (1) pour l'acidité titrable totale; b) 2 cm³ du filtrat nécessitent 4 cm³ 6 de HONa N/30 pour atteindre pH 8,2 en présence de rouge de crésol, soit 460 cm³ pour cette même acidité.

2° Placer 2 cm³ de cette même urine décalcifiée dans le tube T à extraction éthérée de l'appareil décrit page 26; placer directement dedans le tube à entonnoir, et procéder à l'extraction en suivant point pour point le mode opératoire indiqué : extraction de une heure et demie, avec 40 cm³ d'éther neutre exempt d'alcool. L'extraction terminée, retirer le tube T du ballon, et l'entonnoir E du tube T; décanter la plus grande partie de l'éther surnageant, et verser quantitativement le reste de son contenu dans le tube jaugé à 10 cm³ employé pour le premier dosage; joindre 2 cm³ d'eau ayant servi au lavage de ce tube et de la partie inférieure du tube à entonnoir. Porter le tube à essais quelques instants au bain-marie pour chasser l'éther dissous dans l'urine et celui qui surnage. Refroidir sous courant d'eau et titrer comme précédemment l'acidité résiduelle à pH 8,2.

Soit b cm³ de liqueur sodique nécessaires, l'acidité rési-

(1) Le calcul est effectué comme il a été dit p. 43.

duelle de l'urine après enlèvement des acides organiques libres éther-solubles sera $b \times 100 = n$, en $\text{cm}^3 \text{ N}/10$ par litre. L'acidité organique libre éther-soluble est donnée par la différence :

$$N - n.$$

Enfin, nous avons dosé l'acide urique libre. Sous cette dénomination, il faut entendre l'acide urique se trouvant entièrement libre dans l'urine au moment considéré, par rapport à l'acide total existant sous forme libre et d'urates acides, la forme libre étant considérée comme monovalente, le 2^e H acide n'étant saturé qu'à des pH élevés ne rentrant pas dans les limites de l'acidité ionique urinaire.

Pour cela, l'acide urique total a été dosé colorimétriquement suivant le procédé de Morris et Macleod [53] simplifié. Cette méthode nécessite l'emploi d'un réactif arsénitungstique préparé d'après les auteurs, d'une solution étalon d'acide urique, stable, suivant les indications de Laudat [39], et d'une solution de cyanure de sodium à 10 p. 100.

Technique. — Préparer une dilution au vingt-cinquième de l'urine (2 cm^3 et q. s. d'eau distillée pour 50 cm^3). Dans deux tubes à essais A et B, introduire :

	Dans A.		Dans B.
Solution d'acide urique à 25 mg. par litre	1 cm^3	Dilution de l'urine	1 cm^3
Solution de cyanure	2 cm^3 5		2 cm^3 5
Eau distillée	10 cm^3		10 cm^3
Réactif arséno-tungstique...	0 cm^3 5		0 cm^3 5

Homogénéiser par retournement; après dix minutes, comparer au colorimètre en faisant plusieurs lectures et établissant la moyenne.

Soit a la hauteur de la solution titrée et b celle de l'essai; l'acide urique par litre sera :

$$0 \text{ gr } 625 \times \frac{a}{b}$$

Soit A g. d'acide urique par litre;

$$\frac{A \times 1.000}{16.8} = n$$

exprimera cet acide en cm³ de liqueur décijnormale.

Le taux de l'acide libre, par rapport à l'acide total, sera donné comme pour les phosphates monométalliques, en fonction du pH de l'urine et de la constante de dissociation du 1^{er} H de l'acide urique, par un coefficient U, représentant l'acide urique libre pour 100 d'acide total. Ce coefficient, calculé d'après l'équation dérivée de la loi d'action de masses :

$$\frac{\text{A. U. libre}}{\text{urate acide}} = \frac{C(H^+)}{K}, \quad \text{où} \quad K = 1.5 \times 10^{-6}$$

d'après His et Paul [34] est donné par la table suivante :

pH	U	pH	U	pH	U	pH	U
5,3	76,9	5,7	57,1	6,1	34,8	6,5	17,6
5,4	72,0	5,8	51,7	6,2	29,6	6,6	11,2
5,5	68,1	5,9	46,5	6,3	25,0	6,7	8,2
5,6	62,5	6,0	40,0	6,4	21,0	6,8	5,9

L'acide urique libre par litre, c'est-à-dire la part qu'il prend dans l'acidité titrable totale, sera donné par :

$$n \times U.$$

Nous sommes donc en possession des deux éléments principaux de l'acidité organique libre totale : acides organiques solubles dans l'éther d'une part, et acide urique de l'autre.

Notre hypothèse de travail s'est trouvée confirmée, car, en faisant la somme de ces deux éléments, nous avons toujours obtenu une valeur voisine de celle donnée globalement par la méthode de Grimbert et Morel modifiée.

Le tableau suivant met numériquement en valeur ces correspondances, dont il est permis de se montrer satisfait, étant donné l'indépendance absolue des voies suivies pour arriver aux résultats, et le caractère approximatif, indiqué

précédemment, de la séparation de l'acidité organique libre en deux de ses éléments, les plus importants il est vrai.

Urines. N°	pH	A. O. L. éther- soluble.	Acide urique libre.	Somme.	Acidité organique libre totale.
		cm ³ N/10	cm ³ N/10	cm ³ N/10	cm ³ N/10
101	5,9	20	12,5	32,5	39,3
102	6,3	25	7	32,0	27,6
103	5,9	25	13,2	38,2	38,1
104	5,9	30	28,2	58,2	53,6
105	6,5	30	10,6	40,6	34,8
106	5,7	40	30,8	70,8	76,0
107	6,1	30	19,5	49,5	38,4
108	6,2	35	15,8	50,8	50,1
109	6,85	20	2,3	22,3	23,0
111	5,9	20	22,7	42,7	45,2
112	6,1	25	14,5	39,5	38,3
113	6,4	25	8,5	33,5	30,2
114	5,9	30	1,4	48,4	47,7
115	6,1	20	15,1	35,1	28,2
116	5,6	55	25,4	80,4	79,4
117	5,5	55	34,05	89,05	103,2
118	5,4	65	34,6	99,6	137,3
119	6,3	35	7	42,0	41,9
120	6,4	15	6	21,0	25,1
121	6,0	25	11,7	36,7	43,1
122	5,8	30	24	54,0	66,4

CHAPITRE III

LES ACIDES ORGANIQUES VOLATILS

Nous n'avons étudié jusqu'à présent que la quantité globale — bloc anonyme —, des acides organiques totaux de l'urine et la part de ces acides qui peut s'y trouver à l'état libre. Au début de ce travail, nous avons montré l'intérêt qui s'attache à la connaissance des acides qui forment ce bloc, autrement dit à la répartition quantitative de ce dernier entre ses divers constituants. Une telle répartition étant, à l'heure actuelle, impossible à réaliser, nous avons tout d'abord séparé les acides organiques volatils de ceux qui sont fixes.

Parmi les acides organiques urinaires, les plus simples sont ceux qui constituent les premiers termes de la série aliphatique, et qu'une commune propriété, leur volatilité, permet, en arrêtant la série après le terme en C_5 , de grouper sous le nom d'acides volatils. A la vérité, cela ne représente qu'un nouveau bloc, plus petit, détaché du précédent, mais il possède déjà l'avantage de ne contenir qu'un nombre restreint d'éléments qui sont les acides formique, acétique, propionique, butyrique et iso-, valérique et iso-. La détermination de la masse représentée par ce groupe sera donc une notion assez précise dans la répartition des acides organiques urinaires. De plus ce groupe possède une importance quantitative si restreinte qu'il serait probablement très difficile de le démembrer d'une façon plus complète qu'en acide formique, pour lequel nous possédons des procédés de dosage suffisam-

ment précis, en acide acétique, qui paraît être le plus important des acides organiques volatils, et en un reste comprenant les autres acides énumérés.

Des recherches ont déjà été effectuées, principalement par les auteurs allemands, en vue d'évaluer la quantité d'acides gras volatils excrétés en vingt-quatre heures par des sujets normaux et pathologiques. Les traités classiques reproduisent, à peu près en totalité, les résultats de ces recherches et démontrent, par les différences considérables existant entre les chiffres obtenus par les divers auteurs, que les méthodes utilisées sont souvent loin de présenter les garanties de spécificité et de précision nécessaires et qu'une méthode à l'abri de toute critique serait utile à mettre en œuvre.

C'est ainsi que l'on trouve dans Oppenheimer [57] :

« De l'urine de l'homme, des carnivores et même des herbivores, acidifiée avec des acides minéraux, on obtient, par distillation à chaud, une série d'acides gras homologues. Parmi eux, on a pu montrer, par l'analyse de leurs sels, la présence d'acides formique, acétique (Campbell, Buliginsky, Proust), propionique (Salkowsky) et butyrique. Les données sur la quantité des acides gras volatils varient beaucoup suivant les auteurs : Magnus Lévy a trouvé environ 60 mg. exprimés en acide acétique par vingt-quatre heures dans l'urine humaine, et Rosenfeld 4 à 8 fois plus. Le dosage s'effectue, d'après Huppert, en ajoutant à l'urine de l'acide sulfurique jusqu'à ce que sa teneur atteigne 8,5 p. 100 et distillant dans un courant de vapeur d'eau jusqu'à obtention d'un distillat neutre.

» Le dosage quantitatif des acides organiques volatils n'est pas encore au point, et les variations dans les chiffres obtenus s'expliquent par l'utilisation de méthodes insuffisantes. »

Neubauer [54] est plus complet :

« D'après les recherches de von Jaksch et celles, confirmatives, de von Rokitansky, l'urine normale contient de petites quantités d'acides gras volatils, principalement de l'acide acétique, à côté d'acide formique et butyrique. Les acides volatils de 1.500 cm³

d'urine atteignent, d'après les moyennes de von Rokitsky, 54 mg. 5; pour une alimentation exclusivement composée de farineux; cet auteur a vu la quantité de ces acides s'élever à 406 et 417 mg., dont 24 p. 100 d'acide butyrique. Chez des malades fiévreux, il en a dosé 90 et 170 mg. par jour, et jusqu'à 505 dans un cas de pleurésie.

» Von Jaksch donne des chiffres beaucoup plus faibles : à l'état normal, 8-9 mg. seulement; dans des états fébriles, 60-100. mg. Par contre, en opérant une distillation en présence de mélange chromique, il a pu obtenir 900 et 1.500 mg. de sels de sodium de ces acides par 24 heures. Rokitsky attribue la faible valeur des chiffres de von Jaksch au fait que ce dernier opérait la distillation en présence d'une trop petite quantité d'acide.

» H. Strauss et Philippssohn donnent comme chiffres normaux 40 à 80 cm³ de liqueur décinormale; mais ils opèrent en ajoutant à 250 cm³ d'urine 50 cm³ d'acide sulfurique à 20 p. 100, distillant de façon à recueillir 200 cm³ et titrant l'acidité de ce distillat.

« Magnus Lévy, par extraction étherée de l'urine acidifiée par SO₄H² et distillation de l'extrait étheré obtenu, a trouvé 60 cm³ de liqueur normale représentant l'acidité volatile émise pendant soixante jours par un sujet sain au régime normal mixte, soit 10 cm³ N/10 par jour.

» La valeur ainsi trouvée correspond à celle donnée par Rokitsky, mais les méthodes des différents chercheurs fournissent manifestement des chiffres discordants.

» Dans la fermentation ammoniacale de l'urine, il se forme beaucoup d'acides gras. D'après Salkowsky, une urine ainsi altérée contient 15 à 16 fois plus d'acides volatils que l'urine fraîche. »

D'autre part, Slosse [60] rapporte les résultats obtenus par Dakin, Janney et Wakemann, qui, en étudiant 12 urines normales, ont dosé des quantités d'acide formique allant de 30 à 118 mg., avec un moyenne de 60. mg. par vingt-quatre heures, chiffres que Slosse pense entachés d'erreur en excès provenant, en partie, de l'acidification de l'urine avec une quantité assez forte d'acide phosphorique. Les chiffres qu'il

donne sont du même ordre. La méthode qu'il utilise est basée sur « une distillation dans le vide — qui, utilisée seule, se montre insuffisante à extraire tout l'acide — combinée avec l'entraînement par la vapeur d'eau. Le meilleur rendement s'obtient par une distillation prolongée pendant trois heures à 60° qui fournit 600 à 800 cm³ par heure. Dans ces conditions on peut récupérer d'une façon constante 98,2 p. 100 de l'acide formique introduit. L'emploi des acides minéraux doit être évité, et l'acidification obtenue au moyen de l'acide tartrique ».

Ainsi les chiffres trop élevés, dans la plupart des cas, des auteurs allemands proviennent du fait qu'ils effectuaient la distillation en présence de grandes quantités d'acide sulfurique et à la pression ordinaire, ce qui conduisait, par hydrolyse, à la néoformation, en proportions considérables, d'acides de toute sorte, en particulier d'acides volatils.

MÉTHODE DE DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES VOLATILS.

Ces considérations nous ont amené à établir, pour la détermination des acides volatils urinaires, le dosage suivant, très simple et très exact :

Principe. — Les acides volatils de l'urine sont déplacés par l'acide tartrique, distillés dans le vide à une température ne dépassant pas 45 degrés, recueillis dans une petite quantité connue de solution alcaline et dosés par titrage en retour de l'excès de cette dernière.

Appareillage. — Il ne présente rien de particulier; la distillation s'effectue dans un ballon de Kjeldahl (long col), en verre Pyrex, de 200 cm³; un bouchon de caoutchouc laisse passer le tube d'une ampoule à brome et un tube abducteur qui, sans raccord, passe à travers un réfrigérant et va plonger jusqu'au fond d'un tube en verre Pyrex de 22 centimètres de long et 24 millimètres de diamètre, bouché au caoutchouc, le bouchon laissant en outre passer un tube à robinet en communication avec un appareil à faire le vide.

Technique. — Dans le ballon sont placés 20 cm³ d'urine

additionnés de 1 g. 50 d'acide tartrique, en solution aqueuse à 50 p. 100. Dans le tube, mesurer exactement, avec une pipette qui sera toujours la même, 5 cm³ d'une solution cinquième normale d'hydroxyde de sodium et cinq gouttes de solution de phtaléine. L'appareil étant monté, faire le vide et plonger le ballon dans un bain-marie porté à 40-45 degrés. La distillation s'effectue assez rapidement si l'on a soin de placer dans le ballon quelques fragments de terre de pipe pour faciliter l'ébullition; quand il ne reste plus qu'un résidu pâteux, on ajoute, à l'aide du tube à brome, 10 cm³ d'eau privée d'acide carbonique par ébullition, on parfait le vide et laisse la distillation se poursuivre jusqu'à siccité. La titration de l'excès de liqueur alcaline est effectuée dans le tube même, à décoloration exacte, au moyen d'une liqueur centi-normale d'acide sulfurique.

Pour faire le calcul, il suffira de savoir à quelle quantité d'acide sulfurique N/100 correspond, dans les mêmes conditions, 5 cm³ de la solution alcaline N/50. Soit N cm³ (qui sera pratiquement différent, mais voisin de 10); de cette valeur N on retranchera le nombre de cm³ de solution acide employés dans le dosage; la différence correspondra à l'acidité volatile de 20 cm³ d'urine, et multipliée par 5, donnera, en cm³ de solution décimale par litre, les acides volatils de l'urine examinée.

Etude critique. — Parmi les acides organiques volatils urinaires, l'acide formique est celui qui a la plus grande constante de dissociation : elle est de $2,1 \times 10^{-4}$. Pour le déplacer de ses combinaisons salines, il est donc nécessaire d'aller à une valeur de pH suffisamment faible, $\text{pH} = 2$ sensiblement, à laquelle sa courbe de titration nous l'indique comme entièrement libre. A cette concentration ionique, tous les autres acides volatils urinaires sont eux-mêmes complètement libérés. Pour obtenir ce pH, à l'aide de l'acide tartrique, dont le premier hydrogène a une constante de dissociation de $9,7 \times 10^{-4}$, il faut ajouter à 20 cm³ d'urine de concentration moyenne, 1 g. 25 environ de cet acide; avec 1 g. 50, cette concentration ionique est toujours sûrement atteinte.

La distillation étant effectuée à une température qui ne dépasse jamais 45 degrés ne peut donner lieu, sous l'influence de l'acide tartrique, à aucune néoformation d'acides volatils par hydrolyse.

La distillation des 20 cm³ à résidu sirupeux et des 10 cm³ d'eau avec lesquels ce dernier est repris est cependant suffisante, quoi qu'ait observé Slosse, pour retrouver intégralement toute l'acidité volatile introduite; les expériences de contrôle suivantes en donnent la preuve.

Des solutions aqueuses contenant de petites quantités d'acides formique, acétique, butyrique et valérique purs, ensemble, sont préparées. Une partie aliquote est titrée directement en se plaçant dans les conditions de dilution où sont effectuées les titrations quand on opère sur l'urine; puis, une même partie est soumise, après saturation, à la distillation et titration suivant le mode opératoire indiqué.

Acidité volatile introduite.	Acidité volatile retrouvée.	Pourcentage.
—	—	—
(cm ³ N/100)	(cm ³ N/100)	
7,3	7,25	99,3
11,3	11,25	99,5
18,95	18,95	100
40,5	39,3	97
57,2	54,0	94,4

Etant donné que ces chiffres correspondraient, s'ils avaient été fournis par un même volume de 20 cm³ d'urines diverses, respectivement à 36,5; 56,5; 79,75; 202,5 et 286 cm³ de liqueur décinormale par litre, on voit que, jusqu'à 200 cm³ N/10 par litre, concentration énorme et probablement jamais atteinte dans l'urine, le rendement est presque parfait, et qu'il est constamment de 100 p. 100 pour les concentrations normales. Un autre essai le prouve d'ailleurs : une urine a fourni, par cette méthode, $n = 6,85$; comme $N = 9,75$, $N - n = 2,90$ N/100, pour la prise, soit 14 cm³ 5 N/10 par litre d'acides volatils; à une autre prise de 20 cm³ de cette même urine ont été ajoutés 10 cm³ d'une solution renfermant 4 cm³ 25 N/100

d'acidité volatile (mélange des acides précédemment énumérés). La distillation de ce liquide a fourni :

$$n = 2 \text{ cm}^3 \text{ 65; } N - n = 7,10 \text{ N}/100, \text{ sur } 4,25 + 2,90 = 7,15$$

introduits, soit 99,3 p. 100.

La titration permet, si l'on a soin de l'effectuer lentement, en retournant simplement le tube pour homogénéisation après chaque affusion d'acide, sans l'agiter, de percevoir la décoloration à la goutte de liqueur acide centinormale, ce qui donne une approximation d'environ 1,5 à 2 p. 100.

La seule cause d'erreur à envisager ici est due à la présence de carbonates acides dans l'urine. Pour les urines de pH inférieur à 5,8, ces derniers sont en si petite quantité que l'erreur qu'ils introduisent est négligeable; à pH 6, plus des trois quarts de l'acide carbonique total urinaire sont libres et s'échappent dès l'émission. Il sera facile, pour les urines dont le pH sera supérieur à 6, d'extraire le gaz carbonique libéré des carbonates acides par l'acide tartrique, en faisant le vide, à froid, au-dessus de cette urine acidifiée jusqu'à complet dégagement gazeux, puis de continuer le dosage comme indiqué, en recevant les produits volatils dans la liqueur alcaline titrée.

La méthode ainsi instituée est exacte, simple et rapide : il faut couramment trois quarts d'heure pour l'opération complète.

Nous avons pu ainsi déterminer que les acides volatils urinaires éliminés en vingt-quatre heures par un sujet sain varient entre 10 et 20 cm³ de liqueur décimormale; nous sommes loin des chiffres beaucoup plus forts donnés par les auteurs cités, à part ceux de Magnus Lévy.

En possession de cette méthode de dosage, j'ai effectué sur près de cinquante urines d'un même sujet soumis à des régimes très divers, mixte normal, mixte avec prédominance de protides, régime sans protides, etc., ce qui a pour effet de

donner un large champ aux variations de l'élimination journalière, les dosages comparatifs des acides organiques totaux déterminés suivant ma microméthode par extraction à l'éther, et des acides organiques volatils.

Nous n'indiquerons ici que la moyenne des pourcentages obtenus en rapportant les acides volatils à 100 d'acides organiques totaux; ces chiffres se sont étagés de 3,25, valeur la plus faible, à 9,8, valeur la plus forte, et leur moyenne s'est située à 6,2.

On en peut conclure que les acides volatils (formique, acétique, propionique, butyrique et iso-, valérique et iso-) représentent 6 p. 100 environ des acides organiques totaux, à l'état physiologique.

CHAPITRE IV

LES ACIDES ORGANIQUES FIXES

La détermination des acides organiques volatils de l'urine, qui représentent en moyenne 6 p. 100 des acides organiques totaux, laisse donc une proportion considérable, 94 p. 100 environ, de ces acides répartie entre les divers acides organiques fixes, appartenant aux acides gras mono ou biacides, acides alcools, cétoniques, aromatiques et oxy-aromatiques, hétérocycliques, etc.

Parmi eux, il en est un qui présente, au point de vue biologique, une grande importance : l'*acide hippurique*. Il provient, en partie, de l'acide benzoïque ingéré que les aliments apportent, soit à l'état préformé, dans quelques fruits à baies, soit, le plus souvent, sous la forme de corps tels que l'acide quinique et d'autres contenus dans beaucoup de végétaux.

Pour un régime mixte normal, la quantité d'acide hippurique éliminé oscille entre 0 g. 50 et 1 g. 50, chiffre qui peut être d'ailleurs dépassé à la suite d'une grande consommation de végétaux. Mesurée par l'acidité du carboxyle, cette quantité représente à peu près de 30 à 90 cm³ de liqueur décinormale par vingt-quatre heures. On peut déjà se rendre compte qu'il est susceptible de constituer une assez grande part des acides organiques urinaires fixes.

D'autre part, il est un acide que des recherches assez récentes ont montré comme étant un élément constant de l'urine : l'*acide lactique*, sur l'importance biologique duquel nous n'avons pas à nous étendre ici.

La possibilité de déterminer ces deux acides avec assez d'exactitude nous a permis de les séparer du bloc des acides fixes.

Il est d'abord nécessaire de faire l'exposé des méthodes de dosage dont nous nous sommes servi, car elles comportent des modifications apportées à des méthodes existantes en vue de les rendre plus exactes ou plus facilement praticables.

Acide hippurique.

Les méthodes de dosage de l'acide hippurique sont nombreuses. Cette seule constatation suffit déjà à prouver soit leur peu de valeur, soit les difficultés de leur mise en œuvre.

La méthode de van Slyke, qui constitue d'ailleurs le procédé le plus rigoureux de détermination des acides aminés, peut, si on l'adapte convenablement, fournir une méthode satisfaisante de dosage de l'acide hippurique, après hydrolyse de ce dernier en glyocolle et acide benzoïque. Elle a été utilisée par von Betznack [6], qui semble toutefois avoir exagéré les dilutions successives, ce qui conduit à la mesure de volumes gazeux trop minimes ($0\text{ cm}^3\text{ 04}$), et nécessite des coefficients de multiplication énormes grossissant en proportion les erreurs de lecture effectuées.

C'est de cette méthode gazométrique que nous nous sommes servi, nous attachant à rendre le dosage aussi rigoureux que possible dans toutes ses parties. De plus, nous avons substitué à l'appareil de van Slyke, dont la manipulation est assez délicate, un instrument très maniable, convenant parfaitement pour la réaction utilisée, et d'un emploi répandu, l'uréomètre de Mestrezat.

Le dosage ainsi établi comprend trois parties :

1° *Extraction de l'acide hippurique.* — La prise d'essai ne doit pas contenir plus de 20 mg. d'acide hippurique. En général, on prendra 10 cm^3 d'urine, qui seront placés dans une petite capsule en porcelaine et évaporés doucement, au bain-marie à $60\text{--}70^\circ$, à consistance sirupeuse. Ce résidu est porté dans un tube à extraction semblable à celui utilisé pour l'extraction des acides organiques totaux. On rince plusieurs

fois la capsule avec quelques gouttes d'eau distillée que l'on joint au résidu dans le tube, de façon à avoir dans ce dernier 2 cm³ de liquide sensiblement. On ajoute alors 10 gouttes d'acide sulfurique concentré pur. L'appareil est ensuite disposé comme il a été décrit page 28, en plaçant toutefois dans le ballon B 50 cm³ d'éther pur. L'extraction est conduite de la même manière, mais nécessite deux heures pour que tout l'acide hippurique d'une prise qui en contient 20 mg. soit entièrement enlevé par l'éther.

Verser alors l'éther contenu dans le ballon, après l'avoir rapidement refroidi sous courant d'eau, dans une ampoule à décantation de 100 cm³, et l'agiter pendant deux ou trois minutes avec 5 cm³ de solution décinormale d'hydroxyde de sodium. Après séparation de la couche aqueuse, on laisse couler celle-ci dans un tube en verre Pyrex de 22 centimètres de long sur 2 centimètres de diamètre environ. On recommence la même opération avec 5 nouveaux cm³ de liqueur sodique que l'on joint aux premiers dans le tube.

De cette façon, tout l'acide hippurique, avec les autres acides, passe en solution alcaline⁽¹⁾, et l'éther retient une quantité assez considérable de corps extractifs qui se retrouveraient dans le résidu d'évaporation de l'éther suivant le procédé habituellement employé, et chargeraient le liquide d'hydrolyse de produits carbonneux très gênants.

2° *Hydrolyse*. — Nous avons donné la préférence à l'hydrolyse acide effectué à l'aide de l'acide chlorhydrique en concentration à peu près 3 N. Betznak emploie l'acide sulfurique à raison de 1 cm³ pour 10 cm³ de liqueur et opère l'hydrolyse pendant trois heures à l'autoclave à 2 kg. 500 de pression. L'acide chlorhydrique offre l'avantage très grand de pouvoir être chassé par simple évaporation, et de posséder un pouvoir hydrolysant supérieur. Nous avons étudié les conditions de l'hydrolyse chlorhydrique à partir d'une solu-

(1) L'acide hippurique peut être parfaitement caractérisé dans cette solution à l'aide de la réaction de Denigès à l'hypobromite de sodium.

tion d'acide hippurique pur telle que 1 cm³ en contienne 10 mg. à l'aide de plusieurs essais variés comme concentration en acide et durée, résumés dans le tableau suivant :

Solution d'acide hippurique.	Eau.	CHH conc.	Pression.	Temps.	Acide hippurique retrouvé.	Acide hippurique introduit.
cm ³	cm ³	cm ³	kgs	h.	mg.	mg.
1	9	2	2	1/2	5,73	10
1	9	2	2	3/4	7,28	10
1	9	2	2	1	8,32	10
1	9	2	2	1 1/2	9,305	10
1,5	8,5	2	2	1 1/2	14,256	15
1,5	8,5	2,5	2	1 1/2	14,598	15
1,5	8,5	2,5	2	2	14,988	15

ce qui permet d'établir pour l'hydrolyse le mode opératoire suivant : les 10 cm³ de liqueur sodique contenant l'acide hippurique sont additionnés, dans le tube, de 2 cm³ 5 d'acide chlorhydrique fumant (D = 1200), puis mis à l'autoclave pendant deux heures à la pression de 2 kg. Après refroidissement suffisant, le contenu, généralement peu coloré, est versé dans une petite capsule de porcelaine, avec 2 ou 3 cm³ d'eau ayant servi à rincer les parois du tube. La capsule est alors portée au bain-marie bouillant, placé sous la hotte, jusqu'à évaporation à sec. Le résidu est repris avec 2 cm³ d'eau distillée; on ajoute une trace de phénolphthaléine et quelques gouttes de liqueur sodique normale, à faible coloration rose.

3° *Dosage*. — Le procédé gazométrique de van Slyke fournit, pour le glycolle, un rendement anormal conduisant à une erreur en excès de 3 p. 100. Mais nous avons pu nous rendre compte, au cours de nos essais, que cette légère plus-value compensait assez exactement les très faibles pertes qui pouvaient se produire dans la série des manipulations précédentes, aussi soigneusement conduites soient-elles; aussi n'en tiendrons-nous pas compte dans les calculs. Le dosage des acides aminés s'effectue dans l'appareil de van Slyke; il est cependant possible, suivant l'exemple de Bierry, Feuillé, Hazard et Ranc [7], et aussi de Cuny [16], de sub-

stituer à cet appareil un uréomètre d'usage courant et pratique, surtout bien adapté à la mesure des petits volumes gazeux observés dans ce dosage; nous avons employé l'uréomètre de Mestrezat, adapté à la réaction de van Slyke suivant la technique de Delaunay, qui est la suivante :

L'uréomètre est placé sur un mortier contenant 1 kg. de mercure et rempli complètement de ce métal. Verser dans l'entonnoir supérieur le liquide d'hydrolyse réduit à 2 cm³ et neutralisé, et le faire passer dans la cloche graduée. Laver la capsule avec 1 cm³ 8 de solution à 30 p. 100 de nitrite de sodium et joindre ce liquide au premier par la même manœuvre; recommencer avec 1 cm³ de la solution de nitrite. Verser alors dans l'entonnoir 0 cm³ 35 d'acide acétique cristallisable et les faire passer dans la cloche. Le dégagement, favorisé par l'abaissement de pression, est accéléré en agitant doucement l'appareil, après avoir fermé le robinet inférieur. Quand tout dégagement a cessé, porter l'appareil sur une cuve à eau, laver les gaz avec de l'eau. Placer dans l'entonnoir 3 cm³ d'une solution contenant :

Permanganate de potassium	50 g.
Hydroxyde de potassium	25 g.
Eau distillée	1.000 cm ³ .

et en faire passer un peu dans la cloche, après avoir fermé le robinet inférieur; le bioxyde d'azote formé en excès commence à se dissoudre, ce qui produit un vide permettant de faire pénétrer le reste du permanganate. Agiter alors énergiquement, en ouvrant de temps en temps le robinet inférieur immergé, jusqu'à ce que le volume gazeux ne subisse plus aucune diminution. Laver abondamment, par la manœuvre des deux robinets; amener les gaz dans la partie supérieure de la cloche, sans eau d'interposition. Ces gaz sont constitués par l'azote provenant de la réaction et par un peu de gaz non absorbable par le permanganate alcalin et dont le volume n , dépendant des réactifs employés, sera donné par un essai à blanc, avec ces mêmes réactifs, mais sans

amino-acide. L'appareil est enfin plongé dans une cuve à eau; l'équilibre de température et de pression étant réalisé, le volume gazeux est lu, et le poids d'azote correspondant calculé en fonction de la pression et de la température. De ce poids, on retranche celui du volume n de gaz résiduel déterminé dans l'essai à blanc; soit p le poids d'azote ainsi corrigé; l'acide hippurique contenu dans la prise d'essai est donné par

$$p \times 6.35, \text{ en mg.}$$

Acide lactique.

Nous avons adopté le dosage suivant Varkany [65], que nous avons adapté à une plus petite quantité d'urine, en utilisant la titration de Furth et Charnass modifiée par Clausen [14].

1° *Déjéction*. — 10 cm³ d'urine sont additionnés d'un volume égal de réactif phosphotungstique préparé suivant Hugouencq et Morel [37], et filtrés après quelques minutes; 16 cm³ du filtrat, correspondant à 8 cm³ d'urine, sont additionnés de 6 cm³ d'une solution de sulfate de cuivre à 10 p. 100, puis de 1 g. 50 environ d'hydroxyde de calcium pulvérisé; triturer soigneusement, laisser en repos une demi-heure et filtrer sur papier.

2° *Formation de l'aldéhyde*. — Appareil et technique sont ceux de Clausen; on opère sur 11 cm³ du filtrat, et l'oxydation est effectuée à l'aide de permanganate de potassium environ N 40, contenant 1 p. 100 d'acide sulfurique pur.

3° *Titration*. — Elle est effectuée suivant Furth et Charnass, avec une liqueur d'iode N/200, préparée chaque fois à partir d'une solution stock N 40, versée d'une microburette au 1/100^e de cm³.

Soit n cm³ d'iode N/200 consommés, $n \times 62,5$ donnera, en milligramme par litre, l'acide lactique de l'urine examinée.

Nous avons toujours corrigé le chiffre d'acide lactique

donné par les urines contenant de l'acide β -oxybutyrique en nous basant sur le fait, établi par Clausen, que cet acide, en concentration équimoléculaire, fournit un vingtième des corps iodo-titrables donnés par l'acide lactique (1 g. d'acide β -oxybutyrique agissant comme 0 g. 0432 d'acide lactique), lorsqu'on le soumet point par point au traitement indiqué pour la technique de dosage de ce dernier. Ce n'est, à la vérité, qu'une correction à base conventionnelle, mais il est difficile d'éliminer d'une autre façon l'erreur due à l'acide β -oxybutyrique.

RÉPARTITION DES ACIDES ORGANIQUES FIXES.

A l'aide de ces méthodes de titration de l'acide lactique et de l'acide hippurique, nous avons effectué une série de dosages comparatifs sur les urines de vingt-quatre heures d'un sujet sain, toujours soumis à des régimes variés, de façon à faire entrer dans l'établissement des moyennes les influences diverses susceptibles d'être rencontrées à l'état normal.

Sur 42 dosages comparatifs, le pourcentage moyen de l'acide lactique par rapport aux acides organiques totaux a été de 4,8 p. 100, les valeurs extrêmes étant de 1,7 et 7,3, à peu près également éloignées du chiffre moyen (moyenne des deux extrêmes = 4,5).

Sur 30 dosages comparatifs, nous avons trouvé comme pourcentage moyen de l'acide hippurique par rapport aux acides organiques totaux le chiffre de 27 p. 100, avec comme chiffres extrêmes 12,6 et 39,4, encore sensiblement équidistants de la moyenne (moyenne des deux extrêmes = 26).

RÉPARTITION DES ACIDES ORGANIQUES URINAIRES TOTAUX:

En définitive, on peut conclure que, pour 100 d'acides organiques totaux :

- les acides volatils représentent en moyenne, 6,2;
- l'acide lactique, 4,8;
- l'acide hippurique, 27,0;
- soit, en tout, 38,0.

Il reste donc environ 62 p. 100 des acides organiques totaux indéterminés. Parmi ces derniers, il en est deux sur lesquels nous possédons des données physiologiques : l'acide oxalique et l'acide β -oxybutyrique.

Le premier est éliminé à des doses assez variables, mais peut, cependant, s'estimer à 20 mg. au maximum par vingt-quatre heures, à l'état physiologique. Etant biacide et pesant 90 g. par molécule, cela représente environ 4 cm³ de liqueur décimale, ce qui place le pourcentage de l'acide oxalique vis-à-vis des acides organiques totaux à 2 p. 100 sensiblement de l'excrétion moyenne de 200 cm³ du sujet considéré. Il est permis d'ajouter ce chiffre à la répartition que nous venons d'effectuer, ce qui porte à 40 p. 100 la part des acides organiques totaux identifiée.

L'acide β -oxybutyrique ne paraît pas présenter, au point de vue de son élimination physiologique urinaire, un caractère de constance aussi net. Ayant poursuivi une série de recherches de ce genre, Hubbard et Noback [36] ont trouvé, sur 29 urines normales examinées, 12 de ces urines exemptes d'acide β -oxybutyrique, et parmi les autres, des valeurs diverses pouvant atteindre 46 mg. 6 par litre, ce qui porte la moyenne des déterminations à 8 mg. 2, soit moins de 1 cm³ de liqueur décimale. Plus récemment, Behre [4], étudiant l'élimination physiologique des corps cétoniques sur 10 individus normaux, a obtenu une moyenne de 16 mg. 2 d'acide β -oxybutyrique par vingt-quatre heures, soit environ 1 cm³ 5 N/10. Etant donné ces valeurs très faibles et le caractère non constant, semble-t-il, de l'élimination urinaire normale de l'acide β -oxybutyrique, il est difficile de lui faire une place dans la répartition des acides organiques totaux physiologiques.

On voit que la majeure partie de cette dernière (60 p. 100) reste encore à identifier quantitativement; il est probable que le grand nombre d'acides qui la constituent arrive à faire une masse importante avec la faible contribution apportée par

chacun d'eux. Cette considération nous amène également à penser que la présence d'une assez grande quantité d'acide citrique dans l'urine, dont la preuve indiscutable ne paraît pas, à notre avis, avoir été établie de façon certaine, mais qui semble toutefois devoir être admise, trouve largement sa place dans ce « non dosé » des acides organiques urinaires.

Si l'on admet, en effet, les chiffres récemment cités par Ostberg [58], la quantité moyenne d'acide excrété normalement par vingt-quatre heures se place aux environs de 0 g. 60-0 g. 70, soit 87-100 cm³ N/10, l'acide citrique étant tri-acide et pesant 210 g. par molécule. Cela représente de 35 à 40 p. 100 de la moyenne des acides organiques totaux dosés par notre microméthode et limite le « non dosé » de ces acides à 20-25 p. 100 environ.

CHAPITRE V

LE CARBONE ET L'AZOTE DES ACIDES ORGANIQUES

LEUR PART DANS LE CARBONE TOTAL ET L'AZOTE TOTAL URINAIRES

Les acides organiques urinaires font partie — ou plutôt faisaient partie — de ce que l'on est convenu de nommer l'indosé urinaire, ensemble des substances connues et inconnues qui constituait la différence entre le poids total des matières organiques et la somme des poids des matières organiques dosées dans l'urine. Cet indosé urinaire, très important par sa masse, puisqu'il renferme en moyenne 26 p. 100 du total des matières organiques, d'après Donzé et Lambling, s'il ne contient que peu d'azote (6 p. 100 en moyenne), renferme par contre le tiers environ du carbone total (Donzé et Lambling).

Etant donné ces connaissances, et les suppositions que l'on a été logiquement amené à faire sur la composition de ce non-dosé au point de vue carbone et azote, il nous a paru d'un grand intérêt de rechercher, puisque par ailleurs nous sommes en possession d'une méthode de dosage des acides organiques susceptible de nous fournir ceux-ci dans un état d'isolement relativement satisfaisant, quelle était la part de carbone et d'azote qu'ils représentent dans le bilan carboné et azoté urinaire.

Si les acides organiques urinaires ne forment encore qu'un groupe de substances incomplètement inventoriées, puisque nous n'avons pu en identifier que 40 p. 100 en moyenne, cette conception peut se défendre tout de même, le bloc des acides organiques urinaires n'étant, à notre avis, ni mieux ni moins

bien défini que celui des acides aminés que l'on ne sait guère déterminer que par leur azote fonctionnel, peut être moins caractéristique que ne l'est le carboxyle pour les acides organiques.

La réponse à une telle question rentre donc bien dans le cadre d'une étude sur les acides organiques urinaires, et nous verrons qu'elle n'est pas la moins importante de toutes celles que nous nous sommes posées au cours de cette étude. Comme l'intérêt qui s'attache à ces questions exige qu'on ne les sépare pas, nous réunissons les résultats obtenus dans nos expérimentations après avoir exposé séparément les méthodes analytiques dont nous nous sommes servi pour l'azote et le carbone totaux, d'une part, pour l'azote et le carbone appartenant aux acides organiques d'autre part.

PREMIERE PARTIE

TECHNIQUES.

I. — Le carbone total.

Nous avons donné notre préférence, pour le dosage du carbone urinaire total et pour celui des acides organiques, à la microméthode mise au point par Nicloux [56], utilisant l'attaque par fusion alcaline dont l'application macroanalytique avait été réalisée par Lescœur et Dutrieux [43]. La simplicité de son appareillage et de ses manipulations, le petit nombre des réactifs nécessaires et la facilité avec laquelle on peut se les procurer à l'état pur, et en outre les résultats très satisfaisants qu'elle a donnés à ses auteurs au point de vue spécial du carbone urinaire, nous l'ont fait utiliser plutôt que la microméthode par oxydation argento-sulfochromique élaborée par Nicloux.

On en trouvera la description détaillée dans les mémoires cités, et dans le *Précis de chimie analytique*, de Denigès, Chelle et Labat, t. II, p. 89.

A. — *Carbone total de l'urine.*

Nous avons suivi point par point la technique de Nieloux, par oxydation à l'aide du mélange nitro-alcalin et dosage du carbonate formé, en opérant sur l'urine débarrassée de ses phosphates par la baryte.

B. — *Carbone total des acides organiques.*

Le dosage du carbone total des acides organiques urinaires est fort délicat, et les précautions à prendre pour éviter autant que possible les nombreuses causes d'erreur qui peuvent intervenir constituent toute la difficulté de l'opération.

Par l'extraction des acides organiques à l'aide de l'éther, conduite comme je l'ai établi pour leur dosage acidimétrique, on obtient un extrait éthéré contenant, outre ces acides, une petite quantité de substances diverses comprenant des phénols libres, des matières extractives mal définies et des pigments qui n'ont pas été insolubilisés par le sulfate d'ammonium.

Pour éliminer ces causes d'erreur en excès, j'ai établi le mode opératoire suivant, qui conduit à l'obtention d'un chiffre correct pour le carbone, et aussi pour l'azote, des acides organiques urinaires :

1° *Séparation des phénols libres.* — Clausen [14], cherchant à obtenir par le même procédé un extrait éthéré de l'urine exempt des phénols libres, additionnait la prise d'essai (2 cm³ d'urine) de quelques gouttes d'une forte solution tampon de phosphates de pH 7, et faisait une première extraction de quinze minutes avec l'éther qui enlevait ces phénols. Le fait d'amener la réaction ionique du liquide à extraire à ce pH voisin de la neutralité est destiné à protéger, autant que possible, les acides organiques libres de l'urine, qui sont par suite directement solubles dans l'éther, en les faisant passer, en majeure partie, à l'état de sels sous l'action du tampon. Il faut toutefois éviter de dépasser cette valeur de pH, car on

risquerait alors d'amener aussi les phénols libres à l'état de dissimulation alcaline. J'ai préféré, dans ce même but, amener une prise de 2 cm³ d'urine, diluée à 5 cm³, avec de l'eau bidistillée, et additionnée de 0 cm³ 25 de solution de phénol-sulfonephtaléine, à pH 7, à l'aide d'une solution concentrée de phosphate monoacide de sodium, de pH supérieur à 8,5; le nombre de gouttes de cette dernière solution, nécessaire à l'obtention du pH désiré, est noté, et ajouté à une autre prise de 2 cm³ d'urine placée dans un tube T à extraction de l'appareil décrit page 28, et que l'on aura jaugé, très exactement, à l'aide d'un trait de lime fin et circulaire, à 4 cm³ et à 5 cm³. On place dans le ballon B 40 cm³ d'éther neutre et exempt d'alcool, et on procède à l'extraction pendant vingt minutes, le bain-marie étant toujours porté à 70 degrés; les phénols libres passent sensiblement en totalité dans cet éther.

2° *Séparation des matières extractives et des pigments.* — L'appareil est alors retiré du ballon, et le tube à entonnoir du tube à extraction, à travers l'éther qui remplit ce dernier, ce qui le lave extérieurement; l'éther qu'il contient lui-même lave intérieurement la partie inférieure de sa tige, de sorte que l'urine reste quantitativement dans le tube T. L'excès d'éther est enlevé de celui-ci par décantation, et le reste, avec celui qui est dissous dans l'urine, par immersion du tube quelques instants dans le bain-marie. Après refroidissement rapide sous courant d'eau, compléter au trait de jauge de 4 cm³, si l'urine est de concentration normale, à celui de 5 cm³, si elle est de concentration supérieure, ou si elle contient une forte proportion de pigments normaux ou pathologiques, avec le réactif phosphotungstique de Hugounencq et Morel; homogénéiser par retournement, et centrifuger dans le tube même. Le liquide limpide et incolore représente l'urine diluée au demi, ou aux deux cinquièmes, et qui ne cédera plus à l'éther que les acides organiques dans un état d'isolement satisfaisant.

3° *Extraction des acides organiques.* — Dans ce liquide acide, les acides organiques sont déjà pour la plupart à l'état

libre. On en prélève exactement 2 cm³, correspondant à 1 cm³, ou 0 cm³ 8 d'urine, suivant le cas, que l'on place dans un tube T à extraction ordinaire. La saturation ne peut être effectuée ici par le sulfate d'ammonium, l'excès de réactif phosphotungstique du liquide le précipiterait, au moins en partie; on la réalise alors en ajoutant 1 g. de sulfate de sodium pur desséché (si la dissolution n'est pas tout à fait complète, la parfaire en tiédissant le tube au bain-marie, et au besoin en ajoutant quelques gouttes d'eau). On s'assure que tous les acides organiques sont libres en ajoutant quatre gouttes d'acide sulfurique concentré pur, et on procède à l'extraction suivant la technique pendant une heure et demie.

L'extrait éthéré est alors versé quantitativement dans un tube bouchant à l'émeri semblable à celui utilisé pour le dosage, avec quelques cm³ d'éther ayant servi à rincer soigneusement les parois du ballon. Ajouter 0 cm³ 3 de la solution environ 2N de potasse décarbonatée employée dans l'attaque nitro-alkaline du carbone, 2 cm³ d'eau distillée exempte de gaz carbonique, et agiter énergiquement le tube pendant deux minutes. Cette agitation est ainsi réalisée dans une atmosphère exempte de gaz carbonique, l'éther versé dans le tube émettant aussitôt des vapeurs qui chassent complètement l'air qu'il contient. Après repos suffisant pour la séparation de la couche aqueuse, on aspire cette dernière dans une pipette fine et longue, à travers la couche éthérée, et on la reverse, sans souffler dans la pipette, dans le tube en verre Pyrex destiné à la fusion alcaline, que l'on bouche aussitôt. Cette façon d'opérer permet de faire passer les acides organiques en solution alcaline et de placer celle-ci dans le tube à fusion en la préservant du contact de l'air. On répète l'agitation de l'éther avec 0 cm³ 2 de potasse 2N et 2 cm³ d'eau et joint ce liquide aqueux au premier de la même façon; on agite enfin l'éther avec 1 cm³ d'eau qui sert aussi à rincer la pipette intérieurement, et qui est joint aux autres.

4° *Dosage du carbone.* — Le tube en verre Pyrex est alors porté au bain-marie pour chasser l'éther surnageant le liquide

aqueux et celui qu'il contient en dissolution. On ajoute 150 mg. de nitrate de potassium pur, 150 mg. de nitrate de sodium pur, et l'on conduit le dosage comme pour l'urine, en ayant soin d'évaporer très lentement le liquide de volume assez considérable afin d'éviter les projections. Un tel dosage est praticable sur n'importe quelle urine, normale ou pathologique, avec la même exactitude. Lorsque le chiffre des acides organiques dépasse 700 cm³ de liqueur décinormal par litre, il est bon d'opérer sur 1 cm³ 5 ou 1 cm³ du liquide délégué au paragraphe 3, seulement, pour effectuer le dosage sur des prises ne renfermant pas plus de 3 mg. de carbone.

Les calculs seront effectués de façon à rapporter le chiffre obtenu à celui du carbone total des acides organiques par litre d'urine.

II. — L'azote total.

Pour le dosage de l'azote sous ses diverses formes, et en particulier pour celui de l'azote total non protéique et de l'azote total des acides organiques, nous avons employé la microméthode générale de Delaunay [18], dont on trouvera l'exposé dans le *Précis de chimie analytique*, de Denigès, Chelle et Labat, t. II, p. 64.

Pour l'azote total non protéique de l'urine, la technique indiquée a été suivie point par point; pour l'azote total des acides organiques, nous avons opéré sur l'extrait éthéré obtenu exactement de la même façon que pour le dosage du carbone, suivant le mode opératoire que nous venons d'exposer.

Il est à noter que dans le dosage au formol du sulfate d'ammonium résultant de la kjeldahlisation, il est nécessaire de tenir compte de la petite quantité d'ammoniaque apportée par les réactifs, quantité que l'on doit déterminer par une opération à blanc, et que l'on retranchera chaque fois de la valeur trouvée dans l'essai; ceci a une importance capitale dans le dosage de l'azote des acides organiques, dosage qui porte sur une quantité d'azote voisine de 0 mg. 5.

DEUXIEME PARTIE

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

Voici les résultats de mes recherches sur des sujets physiologiques :

Sujets	Rapport C — N	Carbone total	Carbone des acides orga- niques	Azote total	Azote des acides organiques	Pourcentages	
						Carb. (ac d. org.)	Azote (acid. org.)
						Carbone total	Azote total
		g.	g.	g.	g.		
M. L....	0,89	8,20	1,395	9,43	0,28	17,01	3,07
» ...	0,90	10,80	1,815	11,085	0,303	16,80	2,73
» ...	0,85	8,10	1,432	9,51	0,238	17,68	2,50
» ...	0,79	6,85	1,305	8,91	0,258	19,05	2,90
» ...	0,74	11,91	2,206	16,41	0,402	18,52	2,45
» ...	0,71	12,17	2,043	17,085	0,376	16,78	2,21
M. R....	0,69	9,85	1,758	12,835	0,317	19,86	2,48
» ...	0,71	9,05	1,685	12,74	0,301	18,62	2,37
» ...	0,77	9,40	1,593	12,15	0,291	16,90	2,46

Il s'en dégage les faits suivants :

A l'état physiologique, le carbone total du bloc des acides organiques représente une part importante du carbone total urinaire; cette part se montre particulièrement fixe; elle oscille entre 16,8 et 19,8 p. 100, soit sensiblement entre le sixième et le cinquième du carbone total de l'urine.

Nous verrons plus loin toute l'importance de ce fait. Contentons-nous de noter pour l'instant que le carbone des acides organiques fait partie du carbone « inoxydé » de l'urine, présentant une certaine valeur à l'état physiologique, susceptible d'augmentation considérable à l'état pathologique, et sur la forme duquel on est encore très mal renseigné. En 1926, lors de la présentation d'une communication de Kauffmann-Cosla sur le métabolisme des sucres à la séance du 16 novembre de la Société de chimie biologique, M. Javiller ayant demandé sous quelles formes le carbone inoxydé est éliminé par les urines, M. Kauffmann-Cosla répond qu'on l'ignore encore. Voici donc déterminée une de ces formes.

Dans le chapitre suivant, nous allons essayer de tirer de cette connaissance tous les renseignements qu'elle peut fournir sur la répartition du carbone urinaire.

- D'autre part, l'azote de ce même ensemble des acides organiques ne constitue qu'une faible partie de l'azote total, ce qui était à prévoir, car, en dehors de l'acide hippurique, il n'y a guère que l'acide indolacétique, accompagné de quelques homologues, qui contiennent de l'azote. Cette partie représente de 2,2 à 3 p. 100, en moyenne 2,5 p. 100 de l'azote total urinaire, et n'atteint pas la moitié de la moyenne de l'azote indéterminé, que l'on peut évaluer à 6 p. 100 environ, l'acide hippurique n'étant naturellement pas compté dans l'azote dosé
-

CHAPITRE VI

ESSAI SUR LA REPARTITION DU CARBONE URINAIRE

Nous venons de déterminer que le carbone des acides organiques, qui fait partie du carbone « inoxydé » ou incomplètement oxydé de l'urine, représente une part importante du carbone total urinaire. Or, le bilan carboné de l'urine normale n'a pu être établi, jusqu'à présent, qu'avec un déficit, une inconnue considérable, atteignant couramment le tiers, et souvent davantage, du carbone total.

Il peut s'inscrire comme Kauffmann-Cosla et J. Roche [38] l'ont indiqué; et il révèle :

L'existence de deux sources carbonées :

- 1° Des composés azotés de l'urine comprenant l'urée et des composés plus riches en carbone que l'urée : acide urique, créatinine, acides aminés;
- 2° Des composés ternaires de l'urine, « le carbone non lié à l'azote », suivant l'expression de Neuberg, comprenant :
 - a) Des quantités extrêmement petites de produits intermédiaires du métabolisme (acide lactique, aldéhyde acétique, par exemple) et de glucose ayant échappé à l'oxydation;
 - b) Des substances indéterminées, que Kraus et Pregl ont tenté d'isoler, et qui seraient, pour Neuberg, « analogues aux gommes ».

Le carbone urinaire se partage donc en deux fractions très distinctes d'origine et d'importance physiologique : d'une part, celui que l'azote éliminé entraîne avec lui dans des

composés à la fois azotés et carbonés, qui est un carbone « déchet » plus ou moins parfait et qui a une valeur sensiblement constante par rapport au métabolisme général; d'autre part, celui qui appartient surtout à des corps ternaires ou fort peu azotés, tels que l'acide hippurique par exemple. Cette dernière partie constitue une carbonurie physiologique que Nicloux [55] a précisée quantitativement : « Le rapport C/N dans l'urée — dont l'azote représente environ 80 p. 100 de l'azote total — est égal à 0,428. Or, si l'on fait le calcul du rapport C/N sur l'ensemble des corps connus de l'urine, on obtient un nombre atteignant à peine 0,5, alors que le même rapport est fixé expérimentalement aux valeurs moyennes suivantes : 0,66 (Donzé et Lambling), 0,74 (Bouchez et Lambling, Bouchez), 0,87 (Ch. Bouchard) (V. Lambling, *Précis de biochimie*, 3^e éd., p. 497), et à 0,7-0,8 (Bickel et Kauffmann-Cosla). On est donc loin du compte et il faut de toute nécessité admettre, comme je viens de le dire, qu'à côté des substances carbonées et azotées, il existe, à l'état physiologique, dans l'urine, des substances carbonées et non azotées qui seules peuvent contribuer au relèvement du rapport C/N de 0,5, valeur calculée, à 0,7-0,8, valeur expérimentale. Que, par ailleurs, ces substances soient en rapport direct avec ce que Lambling appelle le « non dosé organique », c'est pour moi l'évidence même. »

Bien que le bloc des acides organiques ne constitue pas, à vrai dire, un ensemble de corps carbonés et non azotés, le rapport C/N de ce bloc est très élevé : calculé sur les chiffres que j'ai donnés au chapitre précédent, il est, en moyenne, de 5,64 et apporte dans le relèvement du rapport C/N de l'urine un facteur important, puisque, pour une moyenne de 0 g. 307 d'azote, les acides organiques fournissent 1 g. 693 de carbone.

Dans le but de mesurer l'importance de ce relèvement et d'utiliser ces acquisitions en vue de l'établissement d'une répartition plus poussée du carbone urinaire à l'état physiologique, j'ai poursuivi des expérimentations dont voici les

résultats. Dans l'impossibilité d'établir la répartition exacte des acides aminés pour déterminer, par le calcul, leur carbone constitutif, j'ai fait la convention de considérer tout l'azote aminé comme représenté par glyco-colle (qui, à la vérité, constitue la majeure partie des acides aminés urinaires) et de calculer le carbone de cet ensemble en conséquence, en multipliant l'azote aminé par 1,71; le carbone de l'urée a été obtenu en utilisant le coefficient de 0,428 par rapport à l'azote; celui de la créatinine, le coefficient 0,424 par rapport au poids exprimé en grammes et celui de l'acide urique, 0,337. La somme de ce carbone constitue le « carbone lié à l'azote », et la différence entre le carbone total et sa valeur le « carbone non lié à l'azote », ou carbone ternaire (avec la précision restrictive que nous avons faite), ou carbone incomplètement oxydé.

	Sujets			
	L. Analyse n° 141	L. Analyse n° 142	R. Analyse n° 146	R. Analyse n° 147
En grammes par litre :				
Carbone total.....	11,91	12,17	8,85	9,05
Azote total.....	16,41	17,085	12,835	12,74
Rapport C/N.....	0,74	0,71	0,69	0,71
Carbone de l'urée.....	5,96	6 163	4,597	4,592
Carbone de l'acide urique.....	0,385	0,390	0,304	0,235
Carbone de la créatinine.....	0,797	0,624	0,776	0,691
Carbone des acides aminés.....	0,385	0,423	0,440	0,372
Carbone lié à l'azote.....	7,527	7,600	6,087	5,890
Pourcentage :				
Carbone lié à l'azote.....	45,8	44,4	47,4	46,2
Azote total.....				
Carbone lié à l'azote.....	63,2	62,45	68,77	65,08
Carbone total.....				
En grammes par litre :				
Carbone non lié à l'azote.....	4,383	4,570	2,763	3,160
Carbone des acides organiques.....	2,206	2,043	1,758	1,685
Pourcentage :				
Carbone des acides organiques.....	18,52	16,78	19,86	18,62
Carbone total.....				
Carbone des acides organiques.....	50,3	44,7	63,7	53,32
Carbone non lié à N.....				
Rapport C/N des corps dosés.....	0,60	0,58	0,62	0,60
Carbone dosé sur 100 de carbone total.....	81,72	79,23	88,64	83,70
Carbone non dosé sur 100 de carbone total.....	18,28	20,77	11,36	16,30

Les chiffres obtenus montrent que, à l'état physiologique :

1° Le carbone lié à l'azote représente, en moyenne, 65 p. 100 du carbone total (64,87 d'après nos expériences); de plus, ce carbone lié à l'azote est sensiblement fixe (et dans une très large mesure ceci peut être étendu à la pathologie), par rapport à l'azote total, dont 10 g. emmènent avec eux de 4 g. 5 à 5 g. de carbone, suivant l'importance des excréctions urique, créatinique, ammoniacale et aminée; le jeu des deux dernières est en général contre-balancé par l'excrétion uréique;

2° Le carbone des acides organiques, très constant par rapport au carbone total, présente des variations plus larges par rapport au carbone non lié à l'azote; ceci est dû à la variabilité assez grande du carbone indéterminé neutre; le pourcentage va de 44,7 à 63,7 dans nos expériences;

3° L'apport carboné des acides organiques permet de relever le rapport C/N des corps dosés, qui peuvent dès lors comprendre l'urée, l'acide urique, l'ammoniaque, les acides aminés, la créatinine et le bloc des acides organiques; on arrive alors à des moyennes de 0,604 pour le rapport ainsi calculé, contre 0,712 pour sa valeur expérimentale. Une partie de l'écart est ainsi comblée;

4° Le carbone dosé atteint 83,32 p. 100 du carbone total en moyenne, et le non-dosé, ou indéterminé, 16,68 p. 100, soit un sixième du carbone total.

Ainsi réduit, le carbone non dosé contient encore le carbone glucidique normal, qui a déjà fait l'objet de nombreux travaux, dont le plus récent est celui de P. Ambert [3], le carbone adialysable et bien d'autres formes de carbone, certainement en quantités minimales. Le carbone adialysable paraît représenter, d'après Boivin [11], 0,5 p. 100 environ du carbone total.

Quant au carbone glucidique, Ambert n'en a déterminé l'importance que d'une façon approximative, par rapport au carbone total restant dans le liquide filtré provenant de la

défécation de l'urine par le sulfate de mercure et l'eau de baryte; encore faut-il ajouter qu'il ne s'est basé que sur les résultats d'une seule expérience et que l'urine examinée n'était pas un échantillon prélevé sur l'urine des vingt-quatre heures, mais sur un échantillon provenant de l'émission première après le lever. Les conditions étant ainsi trop particulières pour pouvoir être utilisées au point de vue général, nous ne ferons qu'indiquer l'importance présumée du carbone glucidique par rapport au carbone total, d'après les expériences d'Ambert [22]. La défécation mercurique enlevant à l'urine 64 p. 100 (seul chiffre cité) de son carbone total, les 3 g. 15 par litre de défécât (ramené au volume initial de l'urine par évaporation dans le vide) provenaient donc d'une urine contenant 8 g. 75 de carbone total par litre. Les 0 g. 710 finalement considérés comme glucidiques par l'auteur dans le défécât représentent par suite environ 8 p. 100 du carbone total. On pourrait donc admettre que les glucides, définis par Ambert comme possédant le double caractère d'être entraînés à l'état de combinaison cupro-barytique et d'être mercurio-réducteurs, constituent environ la moitié du carbone indéterminé, soit 8 p. 100 du carbone total, et font régresser à nouveau le carbone indosé à 8-9 p. 100 de ce carbone total urinaire.

Quoi qu'il en soit, étant donné les conditions spéciales, énumérées plus haut, de la provenance de ces derniers chiffres, nous ne les ferons pas entrer dans notre essai sur la répartition du carbone urinaire, que nous écrirons ainsi :

Carbone lié à l'azote.....	64,87	(de 62,45 à 68,77).
Carbone des acides organiques....	18,43	(de 16,78 à 19,86).
Carbone dosé.....	83,32	(de 79,23 à 88,64).
Carbone non dosé.....	16,68	(de 11,37 à 20,77).
	100,00	

CHAPITRE VII

LES ACIDES ORGANIQUES URINAIRES A L'ETAT PHYSIOLOGIQUE

INDICE D'ACIDOSE *INDICE D'ACIDO-CARBONURIE*

Nous avons montré, dans l'étude comparative des chiffres des acides organiques totaux fournis par la méthode de van Slyke et Palmer et par celle que nous proposons, l'importance des écarts constatés entre ces chiffres, et nous nous sommes attaché à rechercher l'explication de ces écarts. Ils sont dus :

1° Au fait que l'acide urique est compté en totalité dans la méthode par titration directe, alors qu'il reste en dehors de la nôtre, basée sur l'extraction à l'éther;

2° A l'action d'un certain nombre de corps intervenant comme causes d'erreur en excès, créatinine, acides aminés, ammoniacque, dans la méthode par titration directe;

3° A l'action de corps tampons non inventoriés au double point de vue qualitatif et quantitatif, et que la défécation au réactif de Lloyd, préconisée par Greenwald, permet d'éliminer.

Il était donc intéressant de reprendre, en y ajoutant des faits nouveaux, à l'aide d'une méthode offrant toutes les garanties de spécificité et de précision désirables, quelques-uns des travaux effectués sur les acides organiques urinaires et presque tous basés sur l'emploi de la méthode de van Slyke et Palmer sans correction des chiffres qu'elle fournit. D'ail-

leurs, il est à remarquer que le point de vue physiologique de la question a été assez peu étudié, et c'est surtout de ce côté que nous avons dirigé nos recherches.

Il est d'abord nécessaire de rappeler que, sous le terme d'acides organiques urinaires, nous entendons toujours comme Desgrez et Polonowsky l'ont fait, « les acides organiques dont le groupement fonctionnel est un carboxyle, libre ou saturé par une base fixe ou volatile, non accompagné dans la molécule du groupement NH_2 capable de le saturer après désamination, et dont la liste de ceux que l'on a pu isoler de l'urine a été donnée dans le premier chapitre, possédant tous le caractère commun qui est leur solubilité dans l'éther ». L'acide urique est toujours mis à part; pour les raisons exposées par ailleurs, l'homogénéité chimique et biologique du groupe de corps ainsi constitué est garantie.

Il nous a paru intéressant, comme l'a déjà fait Goiffon [27], de rapporter les acides organiques urinaires totaux, exprimés en centimètres cubes de liqueur décinormale, à l'élément urinaire qui mesure l'importance du métabolisme protidique, l'urée, les protides figurant parmi les générateurs les plus actifs d'acides organiques. Mais l'urée n'est qu'un test assez imparfait de l'intensité des échanges azotés, dont les déchets sont représentés non seulement par l'azote uréifié, mais aussi par l'azote uréifiable, qui est l'azote ammoniacal. A l'état physiologique, la valeur de ce dernier n'est pas négligeable; et dans les cas d'acidose elle peut prendre une importance telle qu'on peut commettre une erreur assez considérable en ne tenant compte que de l'urée.

Aussi paraît-il de beaucoup préférable d'évaluer l'importance du métabolisme protidique au moyen de l'azote hypobromite, qui fournit directement la valeur de la somme azote uréique + azote ammoniacal, et de rapporter les acides organiques à ce chiffre d'interprétation plus nette. Le rapport ainsi établi, que l'on peut appeler *indice d'acidose*, est d'une fixité remarquable à l'état normal, alors que le chiffre des acides organiques varie dans de grandes proportions. La con-

naissance de la valeur absolue des acides organiques n'est donc pas suffisante pour permettre une interprétation correcte des faits observés et on doit la compléter nécessairement par celle de l'indice d'acidose ainsi défini, dont nous établirons l'importance au cours de ce qui va suivre.

Variations horaires de l'élimination des acides organiques.

La première des causes qui peut avoir une action directe sur la quantité d'acides organiques éliminée est la digestion, puisque c'est au cours de cet acte physiologique que se forment, par dégradations successives, ces acides; de plus, c'est probablement au moment de leur formation en grande abondance que l'organisme a le plus de chances d'en éliminer une certaine partie, le foie, qui paraît être un des organes les plus actifs de leur utilisation, étant, en quelque sorte, surchargé de travail.

Dans le but de nous rendre compte de cette influence, nous avons suivi l'élimination des acides organiques chez un sujet normal en partageant la journée, depuis le lever au coucher en six périodes égales de deux heures et demie chacune, de 7 heures du matin à 10 heures du soir. Un léger déjeuner (café au lait) était pris à 7 h. 30 le matin; le déjeuner à 12 h. 30; le dîner à 8 heures du soir; la composition de ces repas était mixte et libre en proportion et quantité. L'expérimentation a porté sur une période de cinq jours; nous ne donnons, avec les chiffres extrêmes, que les moyennes obtenues, qui expriment, en centimètres cubes N/10, les acides organiques excrétés pendant les périodes indiquées :

Périodes.	Chiffres extrêmes.	Moyenne.	Indice d'acidose.
	(cm ³ N/10)	(cm ³ N/10)	
7 heures à 9 h. 1/2....	13,77 à 46,57	31,94	28,27
9 h. 1/2 à 12 heures....	10,15 à 32,30	21,14	15,8
12 heures à 2 h. 1/2....	17,25 à 33,97	24,31	20,6
2 h. 1/2 à 5 heures....	21,25 à 41,60	32,87	22,0
5 heures à 7 h. 1/2....	17,0 à 22,5	19,64	18,0
7 h. 1/2 à 10 heures....	21,52 à 43,75	29,83	17,3

L'excrétion des acides organiques se montre forte dans les deux premières heures de la journée, non seulement en valeur absolue, mais aussi par le rapport d'acidose, qui accuse pendant cette période une valeur plus forte qu'à aucun autre moment de la journée. Ceci est en concordance avec les observations de L. Mc Laughlin et K. Blunt [15], de même d'ailleurs que les autres variations notées dans ce chapitre. Nous pensons, comme ces auteurs, qu'il peut y avoir décharge d'acides organiques, accumulés pendant la nuit, sous l'influence de causes stimulantes parmi lesquelles l'activité physique peut trouver sa place. Mais, pour les variations constatées au cours de la journée, l'influence de la digestion se manifeste d'une façon fort nette : l'excrétion, faible jusqu'à 12 heures, augmente dès le début de la période digestive et au cours de celle-ci; elle s'abaisse ensuite, pour remonter après le dîner.

Eliminations diurne et nocturne des acides organiques.

L'excrétion totale étant ainsi partagée en quinze heures d'élimination diurne et neuf heures d'élimination nocturne, pendant lesquelles le sujet était à l'état de sommeil, offre les chiffres suivants :

Acides organiques.					
(cm ³ N/40)			(cm ³ N/40)		
157,6 pour 15 h. jour =	10,51 par heure,	et	62,5 pour 9 h. nuit =	6,94 par heure;	
200,34	»	13,35	»	74,25	» 8,25 »
154,4	»	10,3	»	77,25	» 8,58 »
142,17	»	9,48	»	65,6	» 7,3 »
Moyenne.....	10,91 par heure.				7,27 par heure.

L'élimination des acides organiques est donc (un tiers, environ, dans nos expériences) plus faible la nuit, à l'état de sommeil, que le jour. La proportion est la même pour les acides organiques exprimés en valeur absolue et pour l'indice d'acidose, qui est passé de 20,7 pendant le jour à 15,25 la nuit. Ceci concorde avec la sorte de décharge obser-

vée dès le début de la journée, provenant de l'accumulation des acides pendant la nuit, et pourrait fournir une explication convenable aux faits établis par Collip [43], en particulier la diminution de la réserve alcaline pendant le sommeil, et pourrait être rapprochée des hypothèses de Howell [33], d'après lesquelles le sommeil serait dû à l'accumulation dans les cellules des acides produits, et dont l'excrétion est plus lente que la formation pendant le jour; et aussi des crises de sommeil qui surviennent chez les diabétiques en pleine période d'acidose. Il est toutefois à noter que les chiffres d'ammoniaque excrétée que nous avons obtenus ne diffèrent pas sensiblement la nuit par rapport au jour; ceci ne vient pas à l'encontre des conclusions de Fontès et Yovanovitch [24], car les conditions dans lesquelles ces auteurs se sont placés ne sont pas comparables aux nôtres.

Variations avec les régimes.

De très nombreuses recherches ont été faites sur l'excrétion urinaire des acides cétoniques consécutive au jeûne total et au jeûne glucidique. On admet classiquement que la combustion de ces acides, provenant des lipides et des protides, « s'effectue au feu des hydrates de carbone », suivant l'expression de Rosenfeld, et paraît être conditionnée par la présence de glucose et de glycogène dans le foie. Si donc les glucides sont déficients, l'organisme laissera s'éliminer, faute de réunir toutes les conditions nécessaires à leur bonne combustion, des acides organiques en grande quantité. Tout récemment, Widmark [66] a étudié, à l'aide de son procédé d'extraction à l'éther, l'élimination des acides organiques chez un individu rigoureusement privé de glucides pendant un temps suffisant et recevant par ailleurs de très fortes quantités de corps gras (régime de Pétren). Pendant l'administration d'un tel régime, les acides organiques se sont élevés considérablement, pour revenir au taux normal dès la reprise d'un régime contenant des glucides.

Ce point ayant été établi, nous avons seulement recherché quel était le taux d'élimination des acides organiques chez un sujet soumis à différents régimes, mixte, végétal exclusif, ou privé de glucides, sans toutefois recevoir la ration considérable de corps gras que comporte le régime de Pétren. Nous avons conduit nos expérimentations de la façon suivante : le sujet est d'abord soumis, pendant un nombre de jours déterminé, à un régime mixte normal, aussi constant que possible au point de vue composition et quantité des aliments ingérés; la diurèse ayant, comme nous le verrons plus loin, une influence sur l'élimination des acides organiques, la quantité de boisson absorbée, les conditions de température et d'exercice physique doivent être les mêmes pendant toute la durée des expériences. Puis, pendant un nombre de jours égal au premier, le régime spécial institué est suivi. La moyenne des éliminations est calculée et seule retenue, pour éviter les perturbations dues aux variations journalières, qui se produisent toujours, malgré la constance du régime, et les moyennes calculées sur plusieurs jours sont toujours très voisines pour une alimentation constante. Nous avons réuni les résultats dans le tableau suivant :

Nombre de jours.	Analyses	Régime.	Acides	Indice	Acide	Acides
			organiques.	d'acidose.	hippurique.	organiques moins acide hippurique.
	n°s		cm ³ N/10		cm ³ N/10	cm ³ N/10
9.....	92 à 100	mixte	187,8	17,7	56,4	131,4
9.....	101 à 109	végétal	184,07	23,8	61,96	122,11
4.....	111 à 114	mixte	185,95	20,8	50,76	135,25
4.....	115 à 118	pauvre en glucides	229,6	20,5	46,97	182,63

Nous voyons d'après ces chiffres que, par rapport à un régime mixte :

1° Un régime végétal exclusif ne fait pas diminuer sensiblement les acides organiques excrétés, chez un sujet normal. Cependant, on peut observer que ces acides, diminués de l'acide hippurique, qui est plus élevé dans le régime végétal, sont nettement plus faibles (7 p. 100) pendant cette alimen-

tation. L'indice d'acidose est passé de 17,7 à 23,8; cette augmentation, loin de traduire une acidose relative plus grande, n'est produite qu'artificiellement, par suite de la diminution de l'azote hypobromite due au manque de protides. Nous reviendrons plus loin sur cette difficulté d'interprétation.

2° Pour un régime pauvre en glucides, les acides organiques totaux subissent une variation très nette dans le sens prévu, passant de 185,95 à 229,6, et. si l'on défalque l'acide hippurique, de 135,25 à 182,63, soit une augmentation de 35 p. 100; par contre, l'indice d'acidose n'a pas varié (20,5 contre 20,8), ce qui prouve que l'augmentation des acides organiques a été exactement parallèle à celle du métabolisme azoté; la privation de glucides n'a pas été assez complète et assez prolongée pour créer une véritable acidose contre laquelle l'organisme n'aurait pu lutter victorieusement. La recherche des corps cétoniques s'est en effet montrée négative dans tous les échantillons d'urine émis pendant cette période.

Variations avec la diurèse.

Les acides organiques varient encore d'une façon très nette avec la diurèse. Voici, en effet, les moyennes obtenues pendant deux périodes successives de cinq jours au cours desquelles le régime est resté globalement le même, ainsi que toutes les autres conditions, sauf celles de température ayant amené une diminution de un cinquième dans la moyenne du volume d'urine émis :

Analyses.	Volume.	Acides organiques.	Indice d'acidose.	Urée.	Ac. volatils Ac. org. totaux
N°		(cm ³ N/10)			
74 à 78.....	1.032	201,8	17,69	11 g. 4	5,9
77 à 83.....	1.231	245,8	22,76	10 g. 8	7,1

Ces chiffres montrent une augmentation des acides organiques en rapport avec la diurèse, puisque non seulement leur valeur absolue augmente, mais aussi l'indice d'acidose,

dont l'accroissement très sensible ne peut être imputable à la très légère diminution de la quantité d'urée excrétée. Tout se passe comme si une diurèse plus rapide entraînait une plus grande quantité d'acides organiques à travers le rein, les soustrayant à leur utilisation par l'organisme. Ce fait nous a amené à rechercher si cette excrétion favorisée par la diurèse était plus particulièrement accentuée pour les acides volatils, très diffusibles; le pourcentage des acides volatils par rapport aux acides organiques totaux est, en effet, passé de 5,9 à 7,4. Cette rapidité de diffusion plus grande est confirmée par tous les autres chiffres que nous avons obtenus, qui montrent un parallélisme net entre ce pourcentage et le volume d'urine excrétée.

Variations individuelles.

Il est probable que chaque organisme possède une capacité d'oxydation qui lui est propre, et qu'il en est de même pour la facilité avec laquelle il utilise les divers matériaux provenant de son métabolisme. A l'état physiologique on constate en effet, pour un régime mixte, une élimination journalière d'acides organiques présentant des oscillations assez grandes, mais un indice d'acidose relativement fixe.

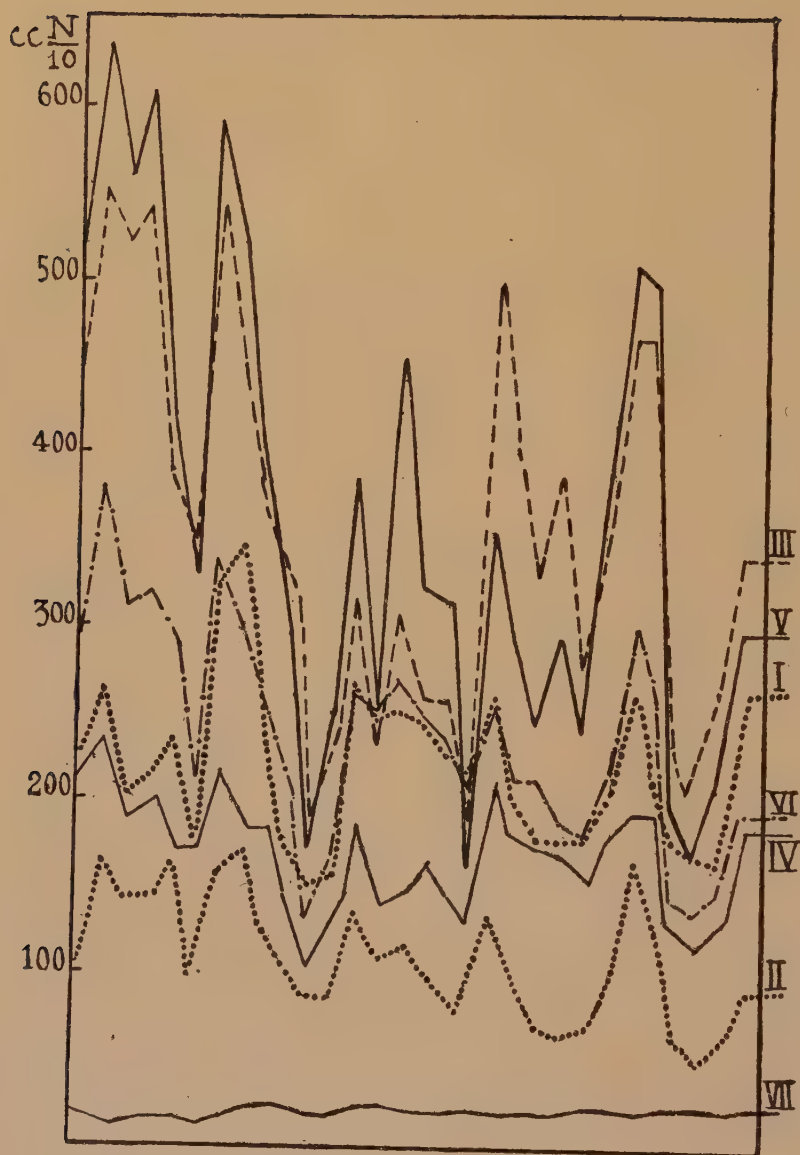
Il est intéressant de constater que chez des sujets qui paraissent normaux, l'étude de l'excrétion des acides organiques, et mieux encore celle de l'indice d'acidose, met en évidence des troubles qu'aucune autre méthode n'aurait été capable de déceler. Dans le tableau qui suit, nous avons en effet classé, non pas parmi les physiologiques, mais parmi les physio-pathologiques, deux sujets offrant des indices élevés et variables traduisant des tendances à l'acidose par suite de combustion ou d'utilisation insuffisantes des acides organiques. Des recherches étendues dans cette direction donneraient certainement des résultats intéressants pour dépister un défaut d'oxydation non décelable par d'autres méthodes.

	Acides organiques.		Indice d'acidose.
	Par litre.	Par 24 heures.	
Physiologiques :	cm ³ N/10	cm ³ N/10	
M. L.	178,0	297,8	23,1
»	252,5	202,0	17,4
»	262,5	219,2	18,2
M. R.	277,8	266,4	25,0
»	215,0	227,9	19,3
»	217,5	213,2	20,3
Physio-pathologiques :			
M. C.	312,5	312,5	31,6
»	472,5	413,4	44,5
»	365,0	367,9	54,0
»	300,0	330,0	32,1
»	245,0	286,7	27,2
M. D.	187,5	290,6	33,5
»	272,5	354,2	49,8

RAPPORTS ENTRE LES ACIDES ORGANIQUES ET QUELQUES ÉLÉMENTS DE L'ÉLIMINATION URINAIRE.

Nous avons recherché si les variations des acides organiques présentaient, avec d'autres éléments de l'élimination urinaire, des relations simples, constantes au moins au point de vue physiologique, et susceptibles de fournir, le cas échéant, des renseignements sur le taux relatif d'élimination des acides organiques. A ce point de vue, nous avons étudié l'urée, ou plutôt l'azote hypobromite, l'azote ammoniacal et aminé, les phosphates et les diverses acidités titrables dont nous avons fait l'étude dans un chapitre précédent.

De l'ensemble de nos recherches il se dégage que l'acidité libre totale et l'acidité organique libre ne présentent, avec les acides organiques totaux, que des rapports assez lointains, sans aucun caractère de constance, et c'est pour cette raison qu'il nous a paru inutile de donner comparativement leurs chiffres d'élimination (nous avons cependant fait figurer, sur la planche représentative des variations, la courbe de l'acidité titrable totale). En effet, l'acidité titrable peut toujours être diminuée par un processus énergétique de défense de la part de l'organisme, par une alimentation riche en bases ou par une médication alcaline. Nous verrons, avec les cas pathologiques, un exemple très net de ce dernier fait. En sorte que, s'il est



I. Acides organiques totaux.....	cm ³ N/10 par litre.
II. Azote hypobromite.....	décigr. »
III. Ammoniaque.....	cm ³ N/10 »
IV. Azote aminé.....	mgr. »
V. Acidité titrable totale.....	cm ³ N/16 »
VI. Phosphates en P ₂ O ₅	décigr. »
VII. Indice d'acidose.	

permis de conclure à une acidose presque certaine par le seul fait d'une acidité titrable totale et d'une acidité organique libre supérieures à la normale, il ne l'est pas d'écarter l'hypothèse d'acidose devant une acidité titrable, totale et organique, normale ou faible, ou même nulle.

Nous avons étudié ces variations sur plus de 30 analyses d'élimination journalière sur un même sujet normal, soumis à un régime libre et varié au point de vue taux de protides, lipides et glucides constitutifs. Les chiffres obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant, et dans les courbes construites avec les chiffres obtenus (analyses n^{os} 92 à 122). Ces derniers expriment, dans le tableau et dans la courbe, les concentrations par litre.

Acides organiques.	Azote hypobromite.	Indice d'acidose.	Azote ammoniacal.	Azote aminé.	Phosphates en P2O5.
cm ³ N/10	g.		g.	g.	g.
227,5	11,14	20,4	0,6375	0,2175	2,9
265,0	17,05	15,54	0,7875	0,2325	3,75
210,0	14,83	14,16	0,7425	0,2525	3,2
222,5	14,55	15,39	0,7575	0,21	3,3
237,5	15,41	15,41	0,57	0,1575	2,9
172,5	11,05	15,61	0,465	0,1725	2,2
322,5	14,72	21,9	0,75	0,2175	3,3
342,5	15,72	21,7	0,66	0,1725	2,95
240,0	12,0	20,0	0,5325	0,1725	2,5
167,5	9,43	17,8	0,4275	0,12	1,975
135,0	6,90	22,4	0,2475	0,09	1,35
157,5	6,47	24,1	0,345	0,135	1,7
265,0	3,45	27,9	0,4425	0,1725	2,6
225,0	8,97	25,08	0,255	0,12	2,3
227,5	9,97	22,8	0,4275	0,1425	2,65
230,0	9,51	24,2	0,33	0,1575	2,45
225,0	9,21	24,4	0,33	0,1425	2,35
200,0	7,84	25,5	0,2175	0,12	1,95
250,0	11,49	21,7	0,6825	0,21	2,505
195,0	9,59	20,5	0,5625	0,1725	2,1
175,0	8,61	20,3	0,465	0,18	2,1
177,5	8,54	20,8	0,54	0,1875	1,95
190,0	8,00	22,5	0,36	0,135	1,8
192,5	9,93	19,4	0,51	0,165	2,15
257,5	12,56	20,6	0,6525	0,195	3,1
230,0	11,88	19,5	0,6525	0,210	2,7
180,0	7,14	25,3	0,33	0,135	1,45
177,5	6,25	28,4	0,3075	0,12	1,4
175,0	7,57	23,1	0,3675	1,1425	1,45
245,0	9,48	25,7	0,48	8,1725	1,8

I. — Azote hypobromite.

L'azote hypobromite a été dosé en suivant exactement la technique de Mestrezat-Janet [32] ; l'uréomètre employé était celui d'Yvon ou de Mestrezat, suivant le volume d'urine dont nous disposions.

Nous nous sommes déjà servi, dans la comparaison des différents chiffres d'acides organiques entre eux, du rapport

$$\frac{\text{Acides organiques}}{\text{Azote hypobromite}}$$

que nous avons appelé *indice d'acidose*. Ce rapport mesure la quantité d'acides organiques excrétés pour un métabolisme azoté connu. La justification de la valeur de cet indice se trouve mise en lumière par l'étude des variations des acides organiques et de l'azote hypobromite, à l'état physiologique. Les courbes d'élimination de ces deux éléments sont en effet d'un parallélisme tel que le quotient d'acidose ne varie que de 13 à 25, et le plus souvent de 20 à 25, et s'inscrit sur une ligne presque droite parallèle à l'axe des abscisses, ceci pour des chiffres de concentration en acides organiques étagés largement entre 155 et 330 cm³ N/10 par litre. En définitive, pour un organisme possédant une capacité d'oxydation normale, les acides organiques minaux sont en rapport direct, simple et constant, avec le métabolisme azoté exprimé par l'azote hypobromite. L'indice d'acidose est, par suite, sensiblement fixe.

II. — Ion phosphorique.

Nous ajoutons qu'à la méthode de Lecomte précédemment indiquée pour le dosage des phosphates en vue du calcul de l'acidité phosphatique, nous avons substitué, pour les dosages à effectuer sur de petites quantités d'urine, ou sur des urines colorées par des pigments d'origine pathologique, la mé-

thode céruléomolybdimétrique de Denigès [32]. Nous avons opéré comparativement à un étalon de phosphate disodique recristallisé, à 0 g. 304 de ce sel par litre, correspondant par suite à 100 mg. de $P^{2}O^{5}$ par litre, convenablement dilué, traité suivant la technique de l'auteur, la comparaison étant effectuée à l'aide du colorimètre de Dubosq, un quart d'heure après la préparation des liqueurs, cette dernière étant aussi simultanée que possible.

Le rapport constant existant entre les phosphates et l'urée (le chiffre des phosphates représente, à l'état physiologique 1/16 à 1/12 de celui de l'urée vraie) entraîne un rapport secondaire entre les phosphates et les acides organiques totaux. Ceci est vrai à l'état physiologique, où l'urée représente un multiple à peu près constant de l'azote hypobromite; par suite, le quotient

$$\frac{\text{Acides organiques (cm}^3 \text{ N/10)}}{P^{2}O^{5} \text{ (en g.)}}$$

se place aux environs de 100, comme on peut le voir d'après les chiffres du tableau. Mais les facteurs qui conditionnent l'excrétion des phosphates sont trop nombreux pour que ces derniers puissent servir de terme de comparaison. De plus, à l'état pathologique, l'azote hypobromite cesse de présenter un parallélisme avec le chiffre des phosphates. Le quotient

$$\frac{\text{acides organiques}}{P^{2}O^{5}}$$

ne semble donc doué que d'une valeur biologique limitée.

III. — Azote ammoniacal.

Le dosage séparé, sur la même prise d'essai, de l'azote aminé a été effectué suivant la microméthode par formol-titration de Delaunay, décrite dans le *Précis de chimie analytique*, de Denigès, Chelle et Labat, t. II, p. 67. Toutefois, nous avons opéré le déplacement de l'ammoniaque, en vue de son enlèvement par aération, par le carbonate de lithium, dont l'emploi a été préconisé par Leclère [41], et adopté par

d'autres expérimentateurs en raison de son pouvoir hydrolysant absolument négligeable (Voïanovitch [71]).

Pour cela on place, dans le tube où s'effectue l'aération, 2 cm³ d'urine, quelques cm³ d'eau distillée, 5-6 gouttes de solution de phtaléine, quelques cm³ d'alcool à 90 degrés, et, goutte à goutte, une solution aqueuse de carbonate de lithium à saturation, à coloration nettement rouge, plus 2 ou 3 gouttes. L'appareil est monté et l'aération effectuée.

Cette modification entraîne, en vue du dosage de l'azote aminé dans le liquide ainsi débarrassé de l'ammoniaque, la précipitation préalable de l'ion carbonique apporté par le carbonate de lithine, à l'aide de 2 cm³ environ de solution saturée de baryte ajoutés au contenu du tube Pyrex; le précipité de carbonate de baryum qui se forme est séparé par filtration, et l'on s'assure qu'il ne reste plus d'ion carbonique en solution à l'aide d'une goutte de baryte saturée. Sur le liquide filtré, le dosage de l'azote aminé s'opère suivant la technique indiquée par l'auteur.

Etant donné les idées actuelles sur l'ammoniurie et en particulier sur la formation de l'ammoniaque par le rein en vue de la saturation de l'acidité que ce dernier doit éliminer, il était intéressant de rechercher une relation possible entre l'ammoniurie et l'organo-acidurie, d'abord au point de vue physiologique.

Comme on peut le voir sur la figure (p. 94), la courbe représentative des variations de l'azote ammoniacal ne suit que de loin celle des acides organiques; mais, par contre, elle suit de très près la courbe des variations de l'acidité titrable totale, fait déjà signalé par Björn Andersen et Lauritzen [9], et d'accord avec les récentes recherches sur le rôle de l'ammoniurie dans le maintien de l'équilibre acide base. Cela se comprend si l'on considère que l'ammoniaque de formation rénale, d'après Nash et Benedict, est destinée à saturer autant que possible l'acidité globale éliminée par le rein, acidité qui se répartit entre les phosphates monométalliques, l'acide urique et les autres acides organiques. Il s'ensuit qu'à

l'état physiologique la tendance à l'acidose est bien mieux mise en évidence par le rapport

$$\frac{\text{acides organiques}}{\text{azote hypobromite}}$$

qui la mesure directement, que par le rapport

$$\frac{\text{azote ammoniacal}}{\text{azote hypobronite}}$$

qui n'en est qu'une mesure indirecte. Nous verrons cependant plus loin que, dans les acidoses pathologiques, ces deux rapports fournissent, en général, des indications concordantes.

IV. — Azote aminé.

Enfin, toujours au point de vue physiologique, l'excrétion des acides aminés paraît présenter avec celle des acides organiques des rapports assez constants, car la courbe représentative des variations de l'azote aminé suit, dans son ensemble, celle des acides organiques, sans toutefois que ce parallélisme soit très rigoureux. Nous avons déjà signalé que l'organo-acidurie est favorisée par la diurèse; d'après Goffin, Rahier et Régnier [26], il semble en être de même pour l'amino-acidurie. Ces faits laisseraient supposer une similitude de comportement de ces deux ensembles d'acides au point de vue du métabolisme physiologique, car au point de vue pathologique, toutes les acidoses ne sont pas forcément accompagnées d'amino-acidurie exagérée, laquelle ne se produit que dans les cas graves d'insuffisance hépatique. Mais des recherches spéciales dirigées dans ce sens seraient nécessaires pour éclairer cette question.

L'INDICE D'ACIDO-CARBONURIE

Le fait de rapporter les acides organiques totaux, exprimés en centimètres cubes de liqueur décinormale, à l'azote hypobromite exprimé en milligrammes par litre, en vue de mesurer la capacité d'oxydation de l'organisme, bien que satisfaisant au point de vue pratique, ne repose pas sur des bases

bien rationnelles. En effet, les acides organiques tirent leur origine, non seulement de la dégradation des protides, mais aussi de celle des lipides et des glucides qui sont des éléments ternaires. Ceci montre que la base devant servir de terme de comparaison à la valeur absolue de leur excrétion doit être un indice aussi exact que possible du métabolisme général, et pas seulement du métabolisme azoté. Nous avons déjà

signalé que le rapport $\frac{\text{acides organiques}}{\text{azoté hypobromite}}$ est artificiellement

augmenté, en dehors de toute production exagérée d'acides organiques, chaque fois que l'importance du métabolisme azoté est seule restreinte, comme par exemple dans les régimes hypo-azotés, pauvres ou totalement dépourvus de protides. On risque alors d'interpréter un tel rapport comme l'indice d'une acidose pathologique, ou de donner à une acidose légère une importance exagérée si l'on ne connaît pas le régime suivi par le sujet considéré.

Une base bien meilleure de comparaison est le carbone total urinaire. Ce dernier comprend, en effet, le carbone lié à l'azote (et qui lui est lié par une relation quantitative proportionnelle, comme nous l'avons déjà vu), qui renseigne aussi bien que l'azote sur l'intensité des échanges azotés, et le carbone non lié à l'azote, ou carbone ternaire, auquel on a été amené à attribuer la mesure du métabolisme des éléments ternaires.

On sait en effet, depuis Bouchard, et toutes les recherches postérieures l'ont confirmé, qu'il existe à l'état physiologique une élimination normale de carbone sous des formes dont une grande partie reste encore indéterminée (voir chap. VI : La répartition du carbone urinaire), élimination qui s'accroît sous l'influence de nombreuses causes dont quelques-unes sont connues, et qu'on est bien forcé d'admettre comme provenant du métabolisme des lipides et des glucides. La meilleure preuve en est que sa valeur ne diminue pas sensiblement (au point de vue absolu, car par rapport à

l'azote total éliminé elle augmente au contraire) dans l'élimination urinaire journalière d'un sujet soumis à un régime sans azote.

On voit par cet exposé qu'il est beaucoup plus logique de rapporter les acides organiques urinaires au carbone total de l'urine qu'à l'azote hypobromite, le premier rendant plus parfaitement compte de l'importance du métabolisme total, protidique, lipidique et glucidique, de l'imperfection duquel les acides organiques tirent leur origine. Cela se confirme très aisément par l'expérience, puisqu'un individu soumis au régime de Petren, presque exclusivement composé de graisses, voit son excrétion d'acides organiques augmenter dans des proportions considérables (Widmark [66]), et par la pathologie, car dans beaucoup de cas de diabète grave (diabète avec acidose), la mauvaise utilisation des hydrates de carbone fait que l'organisme laisse s'éliminer, à côté d'un des produits intermédiaires neutres de leur métabolisme, le glucose, d'autres de ces produits qui sont des acides organiques, les acides cétoniques.

Ce terme d'acidose rend compte de la conséquence physiologique de cette perte de corps encore oxydables que sont les acides organiques, conséquence qui est l'envahissement de l'organisme par un excès d'ions acides. En exprimant en centimètres cubes de liqueur décinormale la quantité, absolue ou relative, des acides organiques ainsi éliminés, on rend compte quantitativement de cette acidose, mais on traduit très imparfaitement la perte totale en éléments énergétiques subie par l'organisme dans cette élimination. Or ces éléments sont surtout composés de carbone, et leur carbone constitutif n'est en rapport ni défini, ni constant, avec leur carboxyle. Ce dernier n'est qu'un caractère commun et spécifique permettant de les doser. Mais il est bien évident que la perte en carbone subie par l'organisme est d'autant plus élevée que le poids moléculaire de l'acide éliminé l'est lui-même. Une même quantité, mesurée à l'aide de l'acidité fonctionnelle, en $\text{cm}^3 \text{ N}/10$, d'acide oxalique et d'acide β -oxybuty-

rique correspond à quatre fois plus de carbone pour ce dernier que pour le premier. . .

Tout cela, joint à la règle élémentaire de l'homogénéité des termes d'un rapport, concourt à établir solidement la valeur du rapport $\frac{\text{carbone des acides organiques}}{\text{carbone total}}$ pour l'établissement du bilan exact de la perte carbonée subie par l'organisme dans l'acidose, et qui est le point essentiel de ce processus pathologique.

Nous proposons de donner à ce rapport le nom d' « *indice d'acido-carbonurie* », puisqu'il mesure la quantité de carbone excrétée sous forme d'acides organiques, et qu'il permet d'être renseigné directement sur la capacité de l'organisme à oxyder ou utiliser ces acides. Il convient de l'exprimer sous forme de pourcentage par rapport au carbone total de l'urine.

Si nous nous reportons aux chiffres donnés dans le chapitre V pour la valeur de ce pourcentage, nous constatons qu'à l'état physiologique l'indice d'acido-carbonurie est remarquablement fixe, puisqu'il oscille entre 16 et 20 seulement. Devant la grande netteté de ce caractère tout indice dépassant 20 traduira un état physio-pathologique ou pathologique dans l'oxydation ou l'utilisation des acides organiques, caractérisé par une acido-carbonurie exagérée, ou dyscarbonurie-acide. La dyscarbonurie est par ailleurs décelée par l'élévation du rapport $\frac{\text{carbone total}}{\text{azote total}}$.

Nous verrons, dans le chapitre réservé à l'étude de quelques cas physio-pathologiques et pathologiques, le classement systématique de la dyscarbonurie s'effectuer à l'aide de la connaissance de l'indice d'acido-carbonurie.

CHAPITRE VIII

UNE ACIDOSE EXPERIMENTALE : L'ACIDOSE LACTIQUE

En possession de ces diverses données physiologiques, il nous a paru intéressant d'appliquer nos méthodes d'investigation à l'étude du comportement d'un organisme normal en face d'une acidose provoquée, pour laquelle les produits d'excrétion sont facilement repérables et dosables. Nous avons choisi à cet effet l'acidose lactique par exercice musculaire. Il n'a pas été dans notre intention de reprendre à ce sujet les expérimentations qui ont déjà été faites en vue de déterminer le mécanisme des phénomènes chimiques qui accompagnent le travail des muscles, dont les plus récentes sont celles de Campbell et Webster [12], Wilson, Long, Thompson et Thurlow [69], Liljestrand et Wilson [45], etc. Nous avons surtout envisagé la confirmation de la valeur du chiffre fourni par notre microméthode de dosage des acides organiques et de l'indice d'acidose, par le double contrôle chimique et biologique.

Instruit par une expérience précédente, au cours de laquelle nous n'avions dosé que les acides organiques totaux, sans suivre l'élimination de l'acide lactique, nous avons opéré de la façon suivante :

L'épreuve a été effectuée le matin, à jeun. Le sujet a d'abord absorbé 200 cm³ d'eau et, à partir de ce moment, 50 cm³ tous les quarts d'heure, pour entretenir une diurèse aussi régulière que possible. Une heure après la première absorption d'eau, la vessie est vidée complètement; une seconde évacuation complète est effectuée au bout d'une demi-heure exactement. L'analyse de cette urine (fiche n° 125) donnera les chiffres de base, auxquels les autres seront rapportés, le

sujet étant resté au repos pendant cette période. Ce dernier commence aussitôt une leçon de culture physique particulièrement dure, prolongée pendant une demi-heure sans arrêt, déterminant une sensation accentuée de fatigue, locale et générale. La vessie est alors vidée complètement, et les chiffres de l'analyse constituent la fiche n° 126. Le sujet restant alors au repos complet, la vessie est vidée une demi-heure après la cessation de l'exercice (fiche 127), et une heure après (fiche 128). Les différentes émissions sont mesurées quantitativement, les déterminations du pH, de l'acidité de titration, des phosphates, de l'azote ammoniacal effectuées aussitôt et les échantillons conservés à l'abri de toute altération jusqu'à analyse complète.

Les résultats sont réunis dans le tableau suivant, divisé en deux parties pour plus de clarté, la première donnant les chiffres divers en concentration par litre, l'autre les valeurs absolues correspondant à l'excrétion totale de chaque période de trente minutes.

La période d'exercice se place entre les deux premières lignes verticales.

Analyses n°.....	En concentration par litre				En valeur absolue excrétion par 30 minutes			
	125	126	127	128	125	126	127	128
pH.....	5.8	5.0	5.2	5.7	"	"	"	"
Volume (cm ³).....	"	"	"	"	40	21	22	24
Acidité titrable totale (cm ³ N/10).....	170.1	668.6	324.3	139.6	6.8	14.4	7.43	3.35
Acidité phosphatique (cm ³ N/10).....	133.7	340.6	232.7	113.9	6.2	7.45	5.42	2.78
Acidité organique libre (cm ³ N/10).....	14.4	328.0	91.6	23.7	0.6	6.89	2.01	0.37
Acides organiques totaux (cm ³ N/10).....	133.0	820.0	363.0	172.5	6.2	47.22	7.3	4.43
Acide lactique (cm ³ N/10).....	7.36	544.1	121.3	45.97	0.294	11.363	2.67	0.383
Acides volatils (cm ³ N/10).....	5.6	45.0	40.0	14.0	0.225	0.3	0.22	0.336
Ammoniaque (cm ³ N/10).....	208.9	747.8	508.8	246.5	8.35	15.07	11.19	5.94
Azote ammoniacal (mg.).....	292.5	1.005.0	712.5	345.0	"	"	"	"
Azote aminé (mg.).....	120.0	277.5	195.0	142.5	4.8	5.83	4.29	2.7
Azote uréique (mg.).....	7.390	10.090	10.100	9.890	29.56	21.49	22.22	23.73
P ₂ O ₅ (mg.).....	1.200	2.454	1.884	880	18.0	31.53	41.45	21.12
Créatinine (mg.).....	910	1.860	1.650	1.390	36.4	39.06	36.3	33.36
Indice d'acidose.....	20.2	74.0	33.8	17.0				
Azote ammoniacal.....	3.81	9.06	6.6	3.38				
100 Azote hypobromite.....	0	0	0	0				
Corps cétoniques.....	0	++	+	0				
Albumine.....	0			0				

Discussion des résultats.

La comparaison entre les variations du pH, de l'acidité titrable totale, de l'acidité phosphatique et de l'acidité organique libre est ici, bien que relativement satisfaisante, moins facile à établir que pour les chiffres fournis par les urines de vingt-quatre heures. On connaît d'ailleurs, dans cet ordre de variables, les valeurs aberrantes constatées dans les prélèvement très rapprochés.

Il est cependant aisé de constater que le pH ne s'abaisse pas en deçà d'une certaine valeur, malgré l'acidité phosphatique et organique énorme, celle dernière atteignant presque la moitié de l'acidité titrable totale. Toutefois, il est curieux de noter que ce chiffre très élevé de 328 cm³ N/10 d'acidité organique libre pour un pH de 5 se place encore sensiblement sur le prolongement de la courbe approchée représentant les variations concomitantes de ces deux données, indiquée p. 47, ce qui confirme son allure asymptotique à un axe parallèle à celui des ordonnées, établissant le blocage du pH malgré l'accroissement de ses déterminantes et, du même coup, l'impossibilité qu'il y a à essayer d'établir des relations *parallèles* entre le pH et une autre variable des éliminations urinaires (Hubbard, etc.).

Fait important, les acides organiques totaux, déterminés par notre méthode, accusent intégralement l'augmentation de l'acide lactique éliminé. En effet, l'acide lactique excrété avant l'exercice était de 0 cm³ 294 par demi-heure; pendant la deuxième demi-heure qui a suivi la fin de l'exercice, l'excrétion a été de 0 cm³ 383; les acides organiques normaux (à teneur en acide lactique normale, soit en moyenne 5 p. 100 de leur totalité, comme nous avons établi précédemment, et comme le montrent d'ailleurs les chiffres de la fiche 123) ont diminué de 6 cm³ 2 à 4 cm³ 13. On peut par suite établir le recouplement ainsi : en admettant que les acides organiques normaux aient diminué régulièrement, on peut, par interpolation, les situer à 6 cm³ 2, 5,5, 4,75 et 4,0 sensiblement

(ce dernier chiffre corrigé du léger excès d'acide lactique restant provenant de l'exercice), pour chaque période d'une demi-heure, ce qui donne un total de 20 cm³ 45. L'acidité lactique normale qui y est comprise, soit 5 p. 100, ce qui fait 1 cm³, est à retrancher de la totalité dosée, c'est-à-dire de la somme 0,294 + 11,363 + 2,67 + 0,383 = 14,71. L'acide lactique dû à l'exercice est, par suite, 14,71 — 1,0 = 13,71. La somme des acides organiques normaux et de ce dernier atteint donc 35 cm³ 16; or il en a été dosé en totalité, par notre méthode, 35 cm³ 85. Toutes choses égales (les approximations que nous avons faites dans notre raisonnement pouvant fort bien atteindre les 2 p. 100 représentés par la différence entre ces deux chiffres), on voit que les acides organiques totaux ont rendu un compte exact de l'acidose lactique.

Cette dernière s'est d'ailleurs manifestée seule, c'est-à-dire n'a été accompagnée d'aucune excrétion anormale d'un ou de plusieurs autres acides organiques : la partie non lactique des acides organiques totaux, qui était de 5 cm³ 91 dans la demi-heure précédant l'exercice, a été de 5 cm³ 86 pendant ce dernier.

L'acidité volatile, en particulier, n'a subi qu'une très légère variation, sous la forme d'une plus-value faible mais nette, ainsi qu'il ressort des chiffres obtenus dans cette expérimentation et dans la précédente, rapportés dans le

Analyses n°.....	En concentration par litre				En valeur absolue excrétion par 30 minutes			
	67	68	69	70	67	68	69	70
Volume (cm ³).....	"	"	"	"	42,5	47	18	25
Acides organiques totaux (cm ³ N/10).....	85,0	485,0	920,0	150,0	3,61	22,8	16,56	3,75
Acides volatils (cm ³ N/10).....	8,0	11,0	21,0	10,5	0,34	0,52	0,43	0,26
Ammoniaque (cm ³ N/10).....	289,0	526,0	790,0	382,5	12,28	24,72	14,22	9,56
Azote uréique (mg.).....	6.277,0	4.740,0	6.780,0	7.343,0	"	"	"	"
P ² O ⁵ (mg.).....	675	1.650	1.400	750	28,5	77,0	19,8	18,7
Indice d'acidose.....	13,5	102,3	135,7	20,4				
Azote ammoniacal.....								
100 Azote hypobromite.....	6,4	45,5	16,5	7,3				

tableau précédent, les excrétiions correspondant toujours à des périodes d'une demi-heure chacune, l'exercice se plaçant entre les fiches 67 et 68.

On voit que les acides organiques totaux et l'indice d'acidose avaient subi, dans cette première expérience, les mêmes variations que dans la seconde, avec des augmentations encore plus fortes. Celle, très faible, des acides volatils, est d'accord avec la notion déjà acquise par Strisower [61] que l'acide formique n'est que fort peu influencé par le travail musculaire.

Au point de vue du maintien de l'équilibre acide-base par l'organisme, il est intéressant de noter le parallélisme certain, beaucoup plus net qu'à l'état normal, entre l'excrétion de l'ammoniaque et celle des acides organiques. Par suite, le rapport $\frac{\text{azote ammoniacal}}{\text{azote hypobromite}}$ traduit assez bien l'état d'acidose, d'une façon cependant moins parfaite que l'indice d'acidose qui en est la mesure directe, ainsi que nous l'avons établi au point de vue physiologique.

Accessoirement, nous pouvons signaler l'augmentation des phosphates, depuis longtemps reconnue d'ailleurs; si cet accroissement est exactement correspondant à celui de la créatinine pendant le travail musculaire, son abaissement consécutif n'a pas été suivi d'une diminution parallèle de la créatinine.

CHAPITRE IX

LES ACIDES ORGANIQUES URINAIRES A L'ETAT PATHOLOGIQUE

Nous avons pu réunir un certain nombre d'analyses concernant des sujets acidotiques dont nous avons étudié les éliminations urinaires à l'aide des mêmes méthodes d'investigation que celles qui ont été utilisées pour les sujets normaux. Une telle étude était des plus intéressantes à effectuer, car elle a permis de confirmer la valeur clinique des résultats déjà acquis au point de vue physiologique, et de mettre en évidence des variations plus frappantes dans les divers éléments considérés.

Voici d'abord quelques analyses concernant deux sujets physio-pathologiques, présentant des tendances à une acidose sans gravité.

M. C... Glycurie faible, mais très fréquente, provenant d'une alimentation normalement très riche en sucres; présence de corps cétoniques dans l'urine en quantités nettement supérieures aux doses physiologiques, pouvant atteindre 300 mg.

	17 nov. 1931 Analyse n° 430	18 nov. 1931 Analyse n° 431	19 nov. 1931 Analyse n° 433	20 nov. 1931 Analyse n° 436	21 nov. 1931 Analyse n° 437
pH.....	5,3	5,5	5,3	5,7	5,4
Acidité organique libre par litre (cm ³ N/10).....	182,1	124,4	130,3	73,1	125,9
Acides organiques totaux par 24 h. (cm ³ N/10).....	312,5	413,4	357,5	330,0	286,6
Acides volatils par litre (cm ³ N/10).....	19,5	14,85	11,55	13,2	15,21
Acide lactique par litre (cm ³ N/10).....	13,26	15,92	16,46	19,25	22,41
Indice d'acidose.....	31,6	44,5	54,0	32,05	27,2
Rapport $\frac{\text{Azote ammoniacal}}{100 \text{ azote hypobromite}}$	4,86	4,4	5,22	3,36	4,91

Si, en valeur absolue, les acides organiques totaux ne sont que peu élevés par rapport à la normale, l'indice d'acidose traduit, par ses oscillations de grande amplitude et ses chiffres élevés supérieurs à 30, une acidose intermittente nette que le coefficient de Maillard passe complètement sous silence, la régulation par saturation à l'aide de sécrétion rénale d'ammoniaque paraissant ne pas jouer. Le taux des acides volatils est normal, mais l'acide lactique nettement élevé.

Effectuée sur l'échantillon n° 137, correspondant à l'indice d'acidose le plus voisin de la normale (27,2), la répartition du carbone urinaire a donné les chiffres suivants :

Carbone total.....	9,45 (g. par litre).
Carbone lié à l'azote.....	4,463 (47,2 p. 100 du carbone total).
Carbone des acides organiques.....	1,92 (38,5 p. 100 du carbone ternaire).
Carbone indéterminé.....	3,067 (32,4 p. 100 du carbone ternaire).
Indice d'acido-carbonurie.....	20,3
Rapport C/N.....	0,94

Le rapport C/N montre une légère dyscarbonurie, mais l'indice d'acido-carbonurie étant à la limite physiologique (20,3), cette dyscarbonurie est neutre, et provient de l'excrétion exagérée de carbone indéterminé (le tiers du carbone total) qui est probablement ici, en majeure partie, glucidique.

M. D... (50 ans). Diminution de la capacité vitale: Etat rhumatismal chronique.

	Analyse n° 144	Analyse n° 143
pH.....	5,9	5,4
Acidité organique libre par litre (cm ³ N/10)...	104,5	149,6
Acides organiques totaux par 24 h. (cm ³ N/10).....	354,2	290,6
Acides volatils par 24 heures (cm ³ N/10).....	15,88	16,9
Acide lactique par 24 heures (cm ³ N/10).....	11,19	5,6
Indice d'acidose.....	49,8	53,5
azote ammoniacal		
Rapport $\frac{\text{azote ammoniacal}}{100 \text{ azote hypobromite}}$	6,98	7,36
Carbone total (g. par litre).....	4,55	6,2
Carbone lié à l'azote (g. par litre).....	2,289	2,966
Carbone des acides organiques (g. par litre)...	1,555	2,295
Carbone indéterminé (g. par litre).....	0,706	0,939
Indice d'acido-carbonurie.....	34,1	37,01
Rapport C/N.....	1,01	1,02

L'indice d'acidose établit une acidose nette (valeur double de la normale), confirmée par le rapport de Maillard. Les acides volatils et lactique sont normaux. L'indice d'acido-carbonurie accuse très nettement la diminution de la capacité d'oxydation de l'organisme : plus du tiers du carbone total est éliminé à l'état d'acides organiques. La dyscarbonurie (rapport C/N dépassant 1), provient d'une acido-carbonurie exagérée, le carbone indéterminé neutre représentant respectivement 15,5 et 15,15 p. 100 du carbone total, valeur normale.

Voici maintenant des cas nettement pathologiques :

Mme X... Acido-cétose sans glycosurie, 20 avril 1931. Volume, 750 cm³.

pH	6,4
Acidité organique libre par litre (cm ³ N/10).....	70,0
Acides organiques totaux par 24 heures (cm ³ N/10).....	592,5
Acides volatils par 24 heures (cm ³ N/10).....	32,6
Acide lactique par 24 heures (cm ³ N/10).....	54,97
Acide β -oxybutyrique par 24 heures (1) (cm ³ N/10).....	141,7 (cm ³ N/10).
Acétone + acide diacétique (1).....	0,667 (g.).
Indice d'acidose	81,9
Azote ammoniacal	16,6
100 azote hypobromite	

On peut déjà remarquer que ni le pH ni l'acidité organique libre ne sauraient, à eux seuls, donner des indications sûres concernant l'acidose; par suite d'une régulation ammoniacale suffisante, cette dernière a été dissimulée, malgré son importance assez grande.

En valeur absolue, l'augmentation des acides organiques s'explique par la plus-value de l'excrétion des acides volatils (plus du double de la normale), de l'acide lactique (au moins quintuplé), de l'acide β -oxybutyrique et de l'acide diacétique. D'autre part, les chiffres de l'indice d'acidose et du coefficient

(1) Les chiffres d'acétone + acide diacétique et d'acide β -oxybutyrique cités au cours de ce chapitre, ont été obtenus soit à l'aide de la méthode de H. Bierry et L. Moquet [8], soit à l'aide de celle de Behre et Benedict [5].

de Maillard sont très augmentés, et établissent aussi l'état d'acidose.

Mme W... Acidose gravidique avec vomissements graves. Grossesse de 6 mois. La malade est traitée à l'insuline dont elle reçoit 20 unités par jour.

	Analyses n°						
	129	132	134	138	139	140	143
	15 nov. 1931	18 nov. 1931	19 nov. 1931	24 nov. 1931	25 nov. 1931	26 nov. 1931	8 déc. 1931
Volume	320	490	685	760	1.220	1.160	1.450
pH.	5,7	6,7	7,4	6,9	7,4	7,7	7,0
Acides organiques libres par litre (cm ³ N/10).....	311,6	29,6	0	31,9	1,42	0	25,0
Acides organiques totaux par litre (cm ³ N/10).....	1.165,0	877,5	277,5	465,0	270,0	242,5	320,0
Acides volatils par litre (cm ³ N/10).....	29,0	16,5	14,75	16,25	18,25	19,25	"
Acides organiques totaux par 24 heures (cm ³ N/10).....	605,8	430,0	190,0	353,4	329,4	246,5	464,0
Azote ammoniacal (mg. par litre).....	1.375	1.245	277,5	780	322,5	255	390
Azote hypobromite, (mg. par litre).....	9 137	7.308	2.852	4.528	2.259	2.171	3.528
Indice d'acidose.....	127,2	120,0	97,3	102,0	119,4	98,0	90,6
Azote ammoniacal	17,2	17,03	9,73	17,2	14,2	11,7	11,05
100 azote hypobromite							
Corps cétoniques.....	+++++	+++	+++	0	0	0	0
Urobiline + urobilinogène ..	+++++	+++	+++	+	0	0	0

Par suite d'une médication alcaline à dose assez grande (eau de Vichy bicarbonatée), le pH a été artificiellement augmenté à des taux élevés, laissant une place à peu près nulle à l'acidité organique libre, qui s'établissait au début, au taux considérable de 311 cm³ par litre; ce camouflage total de l'acidose a été en outre aidé par la régulation ammoniacale. Les acides organiques totaux atteignent des chiffres considérables en valeur absolue, et surtout par rapport à l'intensité du métabolisme azoté, en sorte que l'indice d'acidose est monté jusqu'à 127,2, alors que la normale ne dépasse jamais 30. Cette acidose provenait de l'excrétion de quantités assez élevées d'acides cétoniques, que nous n'avons pas pu doser, et aussi de l'augmentation des acides volatils et lactique, parallèlement aux acides organiques totaux. La lutte de l'organisme contre cette acidose s'est traduite ici par la produc-

tion d'ammoniaque en quantité nettement proportionnelle à la grandeur de l'acidose, si bien que les indications du coefficient de Maillard concordent d'une façon satisfaisante avec celles de l'indice d'acidose direct. Enfin la gravité du processus était encore témoignée par l'excrétion de quantités assez fortes d'urobiline et d'urobilinogène.

Le traitement insulinique a fait régresser l'envahissement acide en arrêtant l'élimination des corps cétoniques, ce qui a remené à une valeur plus normale les acides organiques totaux; de même l'urobilinurie a rapidement cessé.

Il est à remarquer que, malgré l'amélioration clinique, l'indice d'acidose, avec le coefficient de Maillard, est resté à des valeurs élevées (90 et 11 respectivement). Cela tient à la diminution importante du métabolisme azoté qui, en abaissant le dénominateur de ces rapports, en a élevé artificiellement la valeur, et montre qu'il faut se méfier des indications ainsi fournies dans le cas d'un sujet soumis à un régime fortement hypoazoté.

Nous avons effectué la répartition du carbone urinaire sur l'échantillon n° 129 (première analyse, acidose en période d'état); en voici les résultats :

Carbone total.....	14,75 g. par litre.
Carbone lié à l'azote.....	5,311 (37,4 p. 100 du carbone total).
Carbone des acides organiques.....	4,878 (59 p. 100 du carbone ternaire).
Carbone indéterminé.....	3,986
Indice d'acido-carbonurie.....	34,42
Rapport C/N.....	1,3

Le rapport du carbone total à l'azote total (1,3) indique une dyscarbonurie assez élevée; le carbone lié à l'azote régresse par rapport au carbone total, et il y a 4 g. 878 de carbone excrété sous forme d'acides organiques, soit plus du tiers du carbone total, ce qui porte à 34,42 l'indice d'acido-carbonurie. Par ailleurs, le carbone des acides organiques n'atteint que 59 p. 100 du carbone non lié à l'azote, et le carbone indéterminé reste fort. La dyscarbonurie est donc, en quelque sorte, mixte, puisqu'elle provient non seulement

d'une acido-carbonurie exagérée, mais aussi de l'excrétion anormale d'un carbone indéterminé neutre.

Mme F... Diabète avec acidose traité par l'insuline depuis plusieurs années. Grossesse dont le début se place en août, provoquant des crises intermittentes d'acidose.

Analyses n°

	85	124	135	148
	10 mai 1931.	4 nov. 1931.	19 nov. 1931.	17 déc. 1931.
Volume	1.400	1.450	1.945	1.295
pH	5,4	6,3	5,8	5,7
Acidité organique libre par litre (cm ³ N/10)	»	31,0	51,2	60,6
Acides organiques totaux par litre (cm ³ N/10)	160,0	520,0	460,0	795,0
Acides organiques totaux par 24 heures (cm ³ N/10)	224,0	734,0	894,7	1.033,5
Acide lactique par 24 heures (cm ³ N/10)	47,64	41,7	24,76	19,13
Acides volatils par 24 heures (cm ³ N/10)	19,6	50,0	33,25	»
Azote aminé par litre (mg.) ..	180,0	157,5	165,0	180,0
Azote hypobromite (mg.) ...	6.686	6.543	6.053	5.326
Indice d'acidose	23,9	79,0	76,6	149,0
Coefficient de Maillard	8,86	9,46	7,56	15,91
Glucose (g. par litre)	3,5	1,1	5,1	7,5
Acétone + acide diacétique (g. par litre)	0,180	0,52	0,45	0,988
Acide β-oxybutyrique (g. par litre)	»	0,824	0,632	2,194
Carbone total (diminué du carbone du glucose)	»	»	6,91	7,47
Carbone lié à l'azote (g. par litre)	»	»	»	2,81
Carbone des acides organiques (g. par litre)	»	»	2,019	3,468
Carbone non lié à l'azote (g. par litre)	»	»	»	4,66
Indice d'acido-carbonurie ...	»	»	29,22	46,42
Rapport C/N	»	»	0,98	1,22

Acidose croissante caractéristique : les acides organiques totaux passent de 224 cm³ à 1.033,5 par 24 heures. Cette augmentation paraît être due exclusivement à la production d'acides cétoniques en quantités croissantes, les acides volatils et lactique, un peu élevés au début, ayant au contraire

diminué. L'indice d'acidose a suivi la courbe, passant de 23,9, valeur normale, à 149. La régulation par formation rénale d'ammoniaque s'est effectuée normalement, ce qui a conduit à des valeurs parallèles pour le coefficient de Maillard. Toutes les indications données par l'augmentation des corps cétoniques concordent avec celles des acides organiques totaux : la détermination de ces derniers, rapportés à l'azote hypobromite, est donc suffisante pour rendre un compte exact de l'évolution globale de l'acidose.

D'autre part, ce cas est un exemple très net de l'indépendance des processus de transformation des acides organiques et des acides aminés : malgré l'augmentation considérable des premiers, la fonction amino-acidolytique du foie s'est maintenue normale, le taux de l'azote aminé étant resté remarquablement fixe.

Les dernières analyses accusent des rapports C/N de 0,98 et de 1,22, témoins d'une dyscarbonurie élevée. L'échantillon 135 montre un indice d'acido-carbonurie de 29,22; le n° 148, un indice de 46,42 : presque la moitié du carbone total était excrétée sous la forme d'acides organiques: ce carbone acide représente les trois quarts (exactement 74,4 p. 100) du carbone non lié à l'azote. En dehors du carbone du glucose, défalqué par ailleurs, le carbone indéterminé neutre est resté sensiblement normal.

Ces quelques exemples suffisent à donner une idée nette des variations susceptibles d'affecter, au point de vue pathologique, les éléments que nous avons étudiés plus longuement à l'état physiologique, et les relations que ces éléments possèdent entre eux et avec d'autres variables choisies comme tests.

RESUME ET CONCLUSIONS

Mes premières recherches ont eu pour objet de préciser nos connaissances sur les acides organiques de l'urine humaine normale, au point de vue de leur excrétion totale (acides organiques libres + acides organiques combinés) par vingt-quatre heures; sur leur comportement physico-chimique en rapport avec l'acidité ionique urinaire et sur leur répartition (acides volatils et acides fixes : lactique, hippurique et indéterminés).

Il m'a ensuite paru intéressant de déterminer la part que prennent les acides organiques dans l'azote et le carbone total de l'urine; cette connaissance m'a permis d'augmenter le pourcentage du carbone inventorié et d'élaborer un essai sur la répartition du carbone urinaire.

J'ai enfin étudié les relations que l'excrétion des acides organiques présente avec celle de certains autres éléments de l'urine (azote hypobromite, azote ammoniacal, aminé, phosphates). Me basant sur ces relations, j'ai fait connaître deux moyens nouveaux d'investigation clinique : 1° l'indice d'acidose; 2° l'indice d'acido-carbonurie.

Comme complément à cette étude physiologique, j'ai joint les résultats fournis par l'application de nos méthodes à quelques cas pathologiques.

I. — Nouvelle méthode de dosage par extraction à l'éther des acides organiques totaux.

L'examen critique des procédés utilisés en vue de la détermination globale des acides organiques urinaires totaux (acides libres + acides combinés) a montré que :

1° La méthode de titration directe suivant une gamme de

pH déterminée de van Slyke et Palmer fournit en général des résultats entachés de fortes erreurs par excès (créatinine, acides aminés, ammoniacque, corps tampons indéterminés) et que la modification de Greenwald, peu pratique vu l'emploi nécessaire d'un réactif défécant d'usage non courant, conduit au contraire à des chiffres insuffisants;

2° La méthode de Widmark par extraction préalable à l'éther suivie d'un titrage acidimétrique est spécifique, mais elle nécessite un outillage spécial la rendant peu praticable.

M'inspirant de ces faits, j'ai mis au point une microméthode de dosage des acides organiques totaux par extraction à l'éther qui réunit les avantages de la spécificité, de l'exactitude et de la mise en œuvre rapide et facile, avec un matériel que l'on peut construire dans n'importe quel laboratoire. Cette méthode a été décrite dans le chapitre premier.

II. — Nouvelle méthode de dosage des acides organiques libres.

Les acides organiques sont, pour une certaine part, à l'état libre dans l'urine; ils contribuent à l'abaissement du pH et à l'acidité titrable.

Complétant les travaux antérieurs et utilisant leurs enseignements, j'ai mis au point la détermination de l'acidité organique urinaire libre totale. J'ai appliqué la répartition des ions phosphoriques en fonction du pH à la détermination exacte de l'acidité phosphatique, qui est due aux phosphates monométalliques. Introduisant cette correction dans la méthode de Grimbert et Morel, j'ai ainsi attribué à la différence entre l'acidité titrable totale (jusqu'à pH 8,2) et l'acidité phosphatique réelle la mesure exacte de l'acidité organique libre totale.

D'autre part, j'ai pu retrouver en totalité cette acidité organique libre totale en faisant la somme de l'acidité organique libre soluble dans l'éther et de l'acide urique libre dans l'urine. Ceci fait l'objet du deuxième chapitre.

III. — Acides organiques volatils.

Dans un troisième chapitre, j'ai détaché du bloc des acides organiques totaux le groupe de ceux qui sont volatils (formique, acétique, propionique, butyrique et iso, valérique et iso). J'ai institué pour leur dosage une méthode par distillation dans le vide à 40-45 degrés, simple et précise, et j'ai montré que ces acides représentent en moyenne 6,2 p. 100 (chiffres extrêmes 3,25 et 9,8) des acides organiques totaux, exprimés en centimètres cubes de liqueur décinormale.

IV. — Acides organiques fixes. Répartition des acides organiques totaux.

La différence entre les acides organiques totaux et les acides organiques volatils représente les acides organiques fixes. Parmi ces derniers, j'ai dosé séparément l'acide lactique, qui s'élève en moyenne à 4,8 p. 100 (chiffres extrêmes 1,7 et 7,3) des acides organiques totaux, et l'acide hippurique 27 p. 100 (chiffres extrêmes 12,6 et 39,4) (chap. IV).

Si l'on admet pour l'excrétion de l'acide oxalique le chiffre normal moyen de 2 p. 100 des acides organiques totaux, la répartition moyenne de ces acides peut s'inscrire ainsi :

Acides volatils	6,2
Acide lactique	4,8
Acide hippurique	27,0
Acide oxalique	2,0
Acides organiques dosés	40,0
Acides organiques non dosés	60,0

V. — L'azote et le carbone des acides organiques.

J'ai réalisé l'isolement de l'ensemble des acides organiques en vue du dosage de l'azote et du carbone de ces acides à l'aide d'un mode opératoire spécialement établi, comprenant:

- 1° L'enlèvement des phénols libres;
- 2° Défécation phosphotungstique de l'urine ainsi traitée;

3° Extraction par l'éther des acides organiques;

4° Passage de ces acides en solution aqueuse alcaline.

Les acides organiques sont ainsi obtenus dans un état assez pur pour la détermination de leur azote et de leur carbone.

J'ai établi qu'à l'état physiologique :

1° L'azote des acides organiques représente 2,5 p. 100 en moyenne de l'azote total urinaire;

2° Le carbone de ces acides constitue de 1/6 à 1/5 du carbone total.

Le gros apport carboné des acides organiques contribue dans une forte proportion au relèvement du rapport C/N de 0,5, valeur calculée d'après les éléments dosés jusqu'à ce jour, à 0,7-0,8, valeur expérimentale (chap. V).

VI. — Essai sur la répartition du carbone urinaire.

Ceci m'a permis de dresser une répartition du carbone urinaire à l'état physiologique, qui s'inscrit ainsi d'après les résultats obtenus, montrant que le carbone indosé se réduit à un sixième environ du carbone total :

Carbone lié à l'azote, 64,87 (de 62,45 à 68,77);

Carbone des acides organiques, 18,45 (de 16,78 à 19,86);

Carbone dosé, 83,32 (de 79,23 à 88,64);

Carbone non dosé, 16,68 (de 11,27 à 20,77).

Le carbone lié à l'azote a été déterminé en faisant la somme du carbone de l'urée, de l'acide urique, de la créatinine et des acides aminés calculés en glycolle.

VII. — Etude des facteurs influençant l'excrétion des acides organiques.

L'excrétion des acides organiques urinaux totaux est soumise à des variations dont j'ai pu reconnaître quelques causes (chap. VII) :

1° L'organo-acidurie est augmentée pendant les périodes d'activité digestive, c'est-à-dire à la suite des repas.

2° Elle est diminuée pendant la nuit, limitée au temps que le sujet passe à l'état de sommeil. Il semble y avoir une certaine acidose par rétention des acides organiques, fait confirmé par une décharge nette dans les deux premières heures de l'activité qui suivent le lever.

3° Elle varie sous l'influence du régime, à la condition toutefois que les variations de ce dernier soient suffisantes pour créer un déséquilibre dans les processus d'oxydation de l'organisme, processus qui se montrent doués d'une assez grande énergie quand il s'agit d'un organisme normal. Cependant, un régime riche en protides augmente nettement l'organo-acidurie.

4° Elle varie sous l'influence de la diurèse; l'activation de cette dernière semble soustraire les acides organiques à leur utilisation par l'organisme. Il est à remarquer que la vitesse de passage de ces acides à travers le filtre rénal est en rapport direct avec leur volatilité : les acides organiques volatils voient leur pourcentage par rapport aux acides totaux augmenter avec la diurèse.

5° Elle varie enfin avec chaque individu, en raison de ses capacités d'oxydation et d'utilisation des acides organiques.

VIII. — Relations entre les acides organiques et d'autres éléments de l'élimination urinaire.

1° *L'azote hypobromite.*

L'indice d'acidose. — Les acides organiques totaux, exprimés en centimètres cubes de liqueur décimale, affectent, vis-à-vis de l'azote hypobromite, représentant la somme azote uréique + azote ammoniacal, des relations directes et constantes, ce qui lie la valeur de l'organo-acidurie à celle du métabolisme azoté, fait déjà signalé par Goiffon. Ceci m'a permis d'appeler indice d'acidose le rapport

$$\frac{\text{acides organiques (cm}^3\text{N/10)}}{\text{azote hypobromite (g.)}}$$

indice dont la valeur physiologique varie dans des limites relativement étroites, avec une moyenne située vers 25, mais ne dépasse pas 30. Tout indice supérieur à ce chiffre traduit une acidose proportionnelle à sa valeur. Il devient cependant d'une interprétation difficile dans le cas où le sujet suit un régime hypoazoté : l'abaissement du dénominateur l'augmente alors artificiellement.

2° *Les phosphates.*

Consécutivement, l'organo-acidurie présente avec la phosphaturie un certain parallélisme, qui ne paraît présenter qu'un intérêt biologique limité.

3° *L'ammoniaque.*

Par contre, l'ammoniurie ne suit pas exactement l'excrétion des acides organiques; cela s'explique par le fait que la régulation ammoniacale de l'équilibre acide-base doit pourvoir à la saturation de tous les anions formés, dont les acides organiques ne représentent qu'une partie.

4° *Les acides aminés.*

Il semble y avoir une certaine analogie de comportement dans le métabolisme des acides aminés et des acides organiques à l'état physiologique : les courbes d'élimination de ces deux groupes d'acides sont en effet d'un parallélisme assez net. A l'état pathologique (p. 113), il n'en est plus de même. (Ces relations sont étudiées dans le chapitre VII.)

IX. — L'indice d'acido-carbonurie.

J'ai ensuite montré, à la fin du chapitre VII, que le rapport

$$\frac{\text{acides organiques}}{\text{azote hypobromite}}$$

n'évalue l'acidose qu'en fonction du métabolisme azoté. Or les acides organiques tirent leur origine du métabolisme

protidique, lipidique et glucidique, métabolisme général dont le carbone total urinaire est le témoin quantitatif. D'autre part, la perte en carbone subie par l'organisme dans l'acidose est la conséquence importante de ce processus pathologique. L'évaluation de cette perte est fournie par le rapport

$$\frac{\text{carbone des acides organiques}}{\text{carbone total}}$$

rapport que j'ai appelé *indice d'acido-carbonurie*. Cet indice mesure, en effet, la quantité de carbone excrétée sous forme d'acides organiques et permet d'évaluer directement la capacité de l'organisme à oxyder ou utiliser ces acides. A l'état physiologique, il est remarquablement fixe, et oscille entre 16 et 20. Tout indice supérieur à 20 traduit une dyscarbonurie acide par acido-carbonurie exagérée. Enfin sa connaissance permet de classer les dyscarbonuries caractérisées par l'élévation du rapport C/N en dyscarbonuries acides (indice d'acido-carbonurie supérieur à 20), neutres (indice normal, d'où excrétion exagérée d'un carbone indéterminé neutre), ou participant à la fois de ces deux processus (accroissement simultané des carbones acide et neutre).

X. — Acidoses expérimentale et pathologiques.

Enfin (chap. VIII et IX), nos méthodes d'investigation ont été appliquées à l'étude d'une acidose expérimentale (acidose lactique consécutive à l'exercice physique) et à diverses acidoses pathologiques, particulièrement d'acidocétoses.

Ces études m'ont montré la valeur des deux indices qui avaient retenu mon attention au point de vue physiologique.

VU, BON A IMPRIMER :

VU : *Le Doyen,*

C. SIGALAS.

Le Président,

H. DELAUNAY.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Bordeaux, le 9 mars 1932.

Le Recteur de l'Académie,

F. DUMAS.

BIBLIOGRAPHIE

1. AMBERG et MAC CLURE. — *Amer. Journ. of Physiol.*, 1917, **44**, 453.
2. AMBERG et MAYER (Mary E.). — *Amer. Journ. of Physiol.*, 1922, **60**, 564.
3. AMBERT (P.). — Entraînement des sucres et des polyols par le sulfate de cuivre et la baryte. Contribution à l'étude du carbone indosé dans l'urine normale. Thèse Doct. Univ. (Pharm.), Paris, 1929.
4. BEHRE (J.-A.). — Studies in ketone bodies excretion. I. Daily variations in the ketone bodies of normal urine and the ketonuria in short fasts with a note on diabetic ketonuria during insulin treatment. *Journ. of Biol. Chem.*, 1931, **92**, 679.
5. BEHRE (J.-A.). et BENEDICT (S.-R.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1926, **70**, 487.
6. BETZNAK (VON A.). — Die bestimmung der Hippursäure im Harn. *Biochem. Ztsch.*, 1929, **205**, 409.
7. BIERRY, FEUILLÉ, HAZARD et RANC. — Dosage des acides aminés. *C. R. Soc. biol.*, 23 juill. 1913.
8. BIERRY et MOQUET (Mlle). — Dosage des corps cétoniques et de l'acide β -oxybutyrique dans l'urine des diabétiques. *C. R. Ac. Sc.*, 1924, **178**, 816.
9. BJORN ANDERSEN et LAURITZEN. — Über säure u. Ammoniakbestimmung im Urin u. ihre klinische Anwendung. *Ztsch. f. Phys. Chem.*, 1910, **64**.
10. BLAREZ. — L'urine au point de vue chimique et médical, 1907, p. 135.

11. BOIVIN. — L'adialysable urinaire. Sa teneur en carbone et en azote dans l'urine humaine normale. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, p. 76.
12. CAMPBELL et WEBSTER. — The effect of severe muscular work on composition of the urine. *Biochem. Journ.*, 1922, 16, 106.
13. CATTELAÏN (E.). — Les réactions spécifiques de l'acide citrique. Leur application à la recherche et au dosage de ce composé dans les liquides biologiques. *Journ. de Pharm. et Chim.*, 1931, 13, 435.
14. CLAUSEN (S.-W.). — A method for the determination of small amounts of lactic acid. *Journ. of Biol. Chem.*, 1922, 52, 263.
15. COLLIP (J.-B.). — Effect of sleep upon the alkali reserve of the plasma. *Journ. of Biol. Chem.*, 1920, 41, 475.
16. CUNY (L.). — Le dosage des sels biliaires dans la bile et le liquide duodénal. 1930, p. 58.
17. DAKIN (H.-D.). — Physiological oxidations. *Physiol. Review*, 1921, 1, 394.
18. DELAUNAY (H.). — Recherches biochimiques sur l'excrétion azotée des Invertébrés. (I^{re} partie : Introduction. Aperçu historique. Technique). *Bull. Station biol. Arcachon*, 21, p. 41-84.
19. DENIGÈS. — Contribution à l'étude de l'acidité de l'urine physiologique. Thèse Bordeaux, 1884.
20. DENIGÈS, CHELLE et LABAT. — Précis de Chimie analytique, 6^e édit.
21. DESGREZ et POLONOWSKY. — Détermination globale des acides organiques non aminés de l'urine. *C. R. Ac. Sc.*, 1920, 170, 4008.
22. FLEURY et AMBERT. — Contribution à l'étude du carbone indosé et du carbone glucidique de l'urine normale. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1930, 12, 1255.
23. FOLIN et BERGLUND. — A colorimetric method for the determination of sugars in normal human urine. *Journ. of Biol. Chem.*, 1922, 51, 209.

24. FONTÈS et YOVANOVITCH. — Elimination comparée de l'azote total, de l'urée, des acides aminés et de l'ammoniaque pendant la veille et pendant le sommeil. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1923, **5**, 348.
25. GAMBLE (cité par GUILLAUMIN). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1924, **6**, 14.
26. GOFFIN, RAHIER et RÉGNIER. — Recherches sur l'amino-acidurie et l'amino-acidémie, particulièrement dans le diabète et la maladie de Basedow. *Arch. des Mal. de l'App. dig.*, 1927, **17**, 961.
27. GOIFFON (R.). — Le dosage global des acides organiques de l'urine. Leur rapport avec l'alimentation azotée et la cétonurie. *Arch. des Mal. de l'App. dig.*, 1923, **13**, 869.
28. GREENWALD (I.). — Studies on metabolism in Pneumonia. The excretion of organic acid and a method for its determination. *Journ. of Biol. Chem.*, 1930, **85**, 447.
29. GRIMBERT et MOREL. — Détermination de l'acidité urinaire. *C. R. Soc. Biol.*, 1912, **72**, 179.
30. GUILLAUMIN, BESSONOFF et WURMSER. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1923, **5**, 869.
31. GUILLAUMIN (Ch.-O.). — Sur la relation entre la concentration en ions des urines et la nature de leurs sédiments non organisés. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1923, **5**, 455.
32. — Considérations sur l'acidité organique urinaire mesurée à l'aide des méthodes physico-chimiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1924, **6**, 14.
33. HENDERSON et SPIRO (cités par GUILLAUMIN). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1909, **6**, 39.
34. HIS et PAUL (cités par GUILLAUMIN).
35. HOWELL (cité par FONTÈS et YOVANOVITCH). — *Text Book of Physiology*, 1911, p. 162.
36. HUBBARD et NOBACK. — Note on the concentration of the acetone bodies in normal blood and urine. *Journ. of Biol. Chem.*, 1923, **63**, 391.
37. HUGOUNENCQ et MOREL. — *Bull. Soc. Chim.*, 1907, p. 154.
38. KAUFFMANN COSLA (O.) et ROCHE (J.). — Action de l'insuline sur

- la disparition du glucose et les oxydations dans le sang *in vitro*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1926, **8**, 636.
39. LAUDAT. — Méthode d'analyse permettant d'établir la « formule azotée » du sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, **9**, 137.
40. LAUGHLIN (L.-Mc.) et BLUNT (K.). — Urinary excretion of organic acid and its variation with diet. *Journ. of Biol. Chem.*, 1925, **58**, 267.
41. LECLERE (A.). — Dosage de l'ammoniaque urinaire. *C. R. Soc. Biol.*, 1917, **80**, 939.
42. LEMATTE (L.) et DELACROIX (Mlle). — Dosage volumétrique de l'acide phosphorique. Application à l'étude de l'acidité urinaire phosphatique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1924, **6**, 521.
43. LESCOEUR et DUTRIEUX. — Sur un procédé rapide de détermination du carbone dans les mélanges organiques et principalement l'urine. *C. R. Soc. Biol.*, 1919, **82**, 1417.
44. LESCOEUR et VIOLLÉ. — La phosphaturie bicalcique. *Presse méd.*, 1925, p. 483.
45. LILJESTRAND et WILSON. — The excretion of lactic acid in the urine after muscular exercise. *Journ. of Biol. Chem.*, 1925, **65**, 773.
46. MAINZER (F.) et JOFFE (A.). — Die bestimmung der organischen Säuren in Kleiner Harnmengen. *Biochem. Ztsch.* 1929, **207**, 167.
47. MARENZI (A.-D.). — La détermination colorimétrique des phénols de l'urine. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107**, 737.
48. MARSHALL (cité par GUILLAUMIN). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1922, **51**, 5.
49. MESTREZAT (W.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1923, **5**, 91.
50. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1923, **5**, 529.
51. — Techniques courantes de Chimie Clinique, 1930, p. 31.
52. — *Ibid.*, p. 44.
53. MORRIS et MACLEOD. — Estimation of uric acid. *Journ. of Biol. Chem.*, 1922, **50**, 53.

54. NEUBAUER. — Analyse des Harns. T. I, p. 193.
55. NICLOUX (M.). — Dysoxydative carbonurie ou dyscarbonurie ?
Bull. Soc. Chim. Biol., 1926, **8**, 1117.
56. — Microdosage du carbone. Application à la détermination
du carbone urinaire. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, **9**,
639.
57. OPPENHEIMER. — Handbuch der Biochemie. T. III, 1^{re} partie,
p. 634.
58. OSTBERG (O.). — Studien über die Zitronensäureausscheidung
der Menschienniere im normalen und pathologischen
Zustanden. *Skand. Arch. Physiol.*, 1931, **62**, 81, 222.
59. SALANT et WISE. — *Journ. of Biol. Chem.*, 1916, **17**, **28**, 27.
60. SLOSSE (A.). — La signification physiologique et le dosage de
l'acide formique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1920, **2**, 150.
61. STRISOWER (R.). — *Biochem. Ztsch.*, 1913, **54**, 189.
62. THUNBERG (Torsten). — Über das Vorkommen einer Citrico-
dehydrogenase in Gurkensamen und ihre Verwertung
für eine hochempfindliche biologische Farbenreaktion
auf Citronensäure. *Biochem. Ztsch.*, 1929, **206**, 109.
63. VAN SLYKE (D.-D.) et PALMER (W.-W.). — Studies of Acidosis.
XVI : The titration of organic acids in urine. *Journ.
of Biol. Chem.*, 1920, **41**, 567.
64. VAN SLYKE (D.-D.). — On the measurement of buffer values and
the relationship of buffer value to the dissociation
constant of the buffer and the concentration and
reaction of the buffer solution. *Journ. of Biol. Chem.*,
1922, **52**, 525.
65. VARKANY. — Zur methodik der Milchsäurebestimmung in Harn.
Biochem. Ztsch., 1927, **184**, 474.
66. WIDMARK (E.). — Une nouvelle méthode pour l'extraction des
liquides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1928, **10**, 669.
67. — Über die bestimmung äterlösicher Säuren im Harn mittels
Schaukelextraction. *Biochem. Ztsch.*, 1929, **215**, 434.
68. — A source of error in the determination of organic acids
in urine. *Biochem. Ztsch.*, 1929, **216**, 1 (d'après
Physiol. Abstracts, 1930, **15**, 104).

69. WILSON, LONG, THOMPSON et THURLOW. — Changes in the composition of urine after muscular exercise. *Journ. of Biol. Chem.*, 1925, **65**, 755.
70. WORINGER (P.). — La dégradation des acides gras dans l'organisme animal. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1921, **3**, 311.
71. YOVANOVITCH (A.). — Microdosage de l'ammoniaque. Application au dosage de l'ammoniaque urinaire. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1925, **7**, 665.

